



CSIC



**Secuestro de Carbono y Mejora de la Calidad del
Suelo bajo Laboreo de Conservación en Condiciones
Mediterráneas (SO de Andalucía).**

Memoria que presenta

Marco Panettieri

Para optar al título de Doctor por la
Universidad de Sevilla.

Sevilla, 17 de Julio de 2013.

Secuestro de Carbono y Mejora de la Calidad del Suelo bajo Laboreo de Conservación en Condiciones Mediterráneas (SO de Andalucía).

Visado en Sevilla, a 17 de Julio de 2013.

LOS DIRECTORES

Dr. José Manuel Murillo Carpio

Investigador Científico del CSIC

IRNAS-CSIC

Dra. Engracia Madejón Rodríguez

Investigador Científico del CSIC

IRNAS-CSIC

EL TUTOR

Prof. María Elena Fernández Boy

Profesor Titular de la Universidad de Sevilla

Memoria que presenta

Marco Panettieri

Para optar al título de Doctor por la
Universidad de Sevilla.

DOCTOR D. JOSÉ MANUEL PARDO PRIETO, DIRECTOR DEL
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGIA DE
SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CERTIFICA: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Secuestro de Carbono y Mejora de la Calidad del Suelo bajo Laboreo de Conservación en Condiciones Mediterráneas (SO de Andalucía)”, presentada por Marco Panettieri para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento Protección del sistema suelo, planta, agua, bajo la dirección de los Drs. José Manuel Murillo Carpio y Engracia Madejón Rodríguez, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a 17 de Julio de 2013.

*El presente trabajo de investigación se ha realizado gracias a una beca predoctoral JAE-PREDOC de la Junta de Ampliación de Estudios del Consejo Superior de Investigación Científica-CSIC, adscrita a los **Proyectos AGL2008- 00424 y AGL2010-22050-C03-03***

Agradecimientos

A los Drs. Engracia Madejón y José Manuel Murillo, directores de este trabajo, por su interés, implicación y conocimientos transmitidos.

Al Dr. Francisco Cabrera, Investigador Responsable del grupo AGR 108 de l PAIDI en el que estoy integrado.

Al Dr. Félix Moreno por su supervisión general del trabajo realizado.

A la Dra. Elena Fernández, tutor de este trabajo, por haber aceptado la tutoría del mismo, así como por su amabilidad y disponibilidad para cualquier consulta.

A la Doctora Heike Knicker por haberme enseñado mucho sobre NMR, por su paciencia y por haberme ayudado en contactar con los investigadores responsables de mis estancias en el extranjero.

I would like to thank Dr. Anne Berns and Prof. Patrick Hatcher, for supervising my work during the fellowships in Germany and USA and for teaching me the spectrometric techniques I used.

A la dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla IRNAS-CSIC, por haber permitido el desarrollo de este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Helena Gomez Macpherson y a Inmaculada Carmona del Instituto de Agricultura Sostenible IAS-CSIC y su grupo de investigación por haberme ayudado muchísimo en el desarrollo del trabajo.

A l@s compañ@rs del departamento “Protección del sistema suelo, planta, agua”: las doctoras Paula y Rosa, por seguir contestando a mis numerosas preguntas, a Iván, María del Mar y Patri, por ayudarme en mi trabajo y por hacer más livianas las horas pasadas en el Instituto, a Ignacio por su ayuda en los muestreos. A todos los alumnos de prácticas que han pasado por el departamento, en especial a Laura Lázaro.

Al personal del Servicio de Análisis, la Dra. Pilar Burgos, Chona, Cristina, Rocío y Álvaro, por procesar el número elevado de muestras con simpatía y profesionalidad.

A todo el personal del IRNAS en general, sobre todo al grupo de los becarios futboleros (y relativos jefes) y a las becarias que han aliviado las comidas en el IRNAS.

A papá, Nadia e Valentina, semplicemente per essere la mia famiglia e avermi fatto diventare quello che sono.

A los amigos “internacional-sevillanos” que, aunque hayan ralentizado el desarrollo del trabajo, ¡lo han hecho con mucho arte!

A Lisa, por aguantarme todos los días 24 horas al día y por hacerme feliz...

Alle mie nonne che se ne sono andate in questi anni, senza aver avuto la possibilità di salutarle.

A mia madre, che sarebbe stata molto felice di vedere quello che ho fatto qui...

ABREVIATURAS EN ORDEN ALFABÉTICO

Se remite al texto de las publicaciones para las abreviaturas incluidas en los artículos.

AC	Agricultura de Conservación
AF	Ácidos fúlvicos
AH	Ácidos húmicos
AS	Actividad arilsulfatasa
β-glu	Actividad β-glucosidasa
¹³C CPMAS RMN	Espectrometría de resonancia magnética nuclear de ¹³ C por polarización cruzada y rotación en el ángulo mágico
CBM	Carbono de la Biomasa Microbiana
CH	Carbono hidrosoluble
COT	Carbono orgánico total
CP	Polarización cruzada
DHA	Actividad deshidrogenasa
FT-ICR MS	Espectrometría de masas de resonancia iónica-ciclotrónica a transformada de Fourier
HR-MAS NMR	Espectrometría de resonancia magnética nuclear de alta resolución y rotación en el ángulo mágico
INT	2- <i>p</i> -iodofenil-3- <i>p</i> -nitrofenol 5 fenil tetrazolio
INTF	Iodonitrofenil formazano
LC	Laboreo de conservación
LP	Lomos permanentes
LR	Laboreo reducido
LR_C	Laboreo reducido, experimento de corta duración de la finca “La Hampa
LR_L	Laboreo reducido, experimento de larga duración de la finca “La Hampa
LT	Laboreo tradicional
LT_C	Laboreo tradicional, experimento de corta duración de la finca “La Hampa

LT_L	Laboreo tradicional, experimento de larga duración de la finca “La Hampa
LT_M	Laboreo tradicional, experimento de media duración de la finca “La Hampa
MAS	Rotación en el ángulo mágico
MO	Materia orgánica
MOP	Materia orgánica particulada
MOP-L	Materia orgánica particulada fracción “libre”
MOP-O	Materia orgánica particulada fracción “ocluida”
MUB	Tampón universal modificado
NBM	Nitrógeno de la biomasa microbiana
NL	Laboreo cero o no laboreo
NL_C	No-laboreo, experimento de corta duración de la finca “La Hampa
NL_M	No-laboreo, experimento de media duración de la finca “La Hampa
PA	Actividad fosfatasa alcalina
PNF	<i>p</i> -nitrofenol
PNG	<i>p</i> -nitrofenol-glucopiranósido
PNP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PNS	<i>p</i> -nitrofenilsulfato
POxC	“Permanganate Oxidizable Carbon” (Carbono activo)
PR	Actividad proteasa
RMN	Resonancia magnética nuclear
SH	Sustancias húmicas
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
-T	Surcos no sujetos a tráfico
+T	Surcos sujetos a tráfico

ÍNDICE

Summary/ Resumen

<u>I. – INTRODUCCIÓN</u>	1
I.1. El laboreo en agricultura: definición, finalidad y tipos	3
I.1.1. Laboreo tradicional	4
I.1.2. Laboreo de conservación	5
I.2. Laboreo de conservación vs. laboreo tradicional	7
I.2.1. Problemática del laboreo tradicional	7
I.2.2. Ventajas y desventajas del laboreo de conservación	8
I.2.2.1. Ventajas técnico-económicas	8
I.2.2.2. Ventajas ambientales (calidad: aspectos físicos, químicos y biológicos)	9
I.2.3. Desventajas del Laboreo de Conservación	13
I.3. Índices de calidad del suelo	14
I.3.1. Materia orgánica y fracciones de carbono orgánico del suelo.	14
I.3.2. Parámetros bioquímicos y actividades enzimáticas.	15
I.3.3. Suelo masivo y fraccionamiento por tamaño, densidad y estructura química.	17
I.3.4. Índices de calidad aplicados en fincas comerciales.	19
I.3.5. Técnicas espectrométricas aplicadas a muestras de suelo.	20
<u>II. – OBJETIVOS</u>	23
<u>II. – MATERIALES Y MÉTODOS</u>	27
III.1. Áreas de estudio	29
III.1.1. Finca “La Hampa”	29
III.1.2. Finca “Alameda del Obispo”	33
III.1.3. Finca “Las Navas”	36
III.1.4. Fincas comerciales	40

III.2. Muestreo y análisis de suelos	40
III.2.1. Toma y preparación de muestras	40
III.2.2. Determinación de propiedades químicas	41
III.2.3. Determinaciones biológicas y actividades enzimáticas.	42
III.2.4. Espectrometría de resonancia magnética nuclear	46
III.2.5. Espectrometría de masas de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de fourier (FT-ICR MS).	52
III.2.6. Tratamiento estadístico de los resultados	53

IV. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS **55**

IV.1. Efectos de una labor agresiva sobre un suelo erosionable previamente cultivado bajo no-laboreo.	57
IV.2. Relación temporal entre actividades enzimáticas y degradación de la materia orgánica en un suelo bajo distintos sistemas de laboreo: estudio de una cronosecuencia.	59
IV.3. Laboreo de conservación y uso de herbicidas: influencia del glifosato sobre los bioindicadores de calidad del suelo.	67
IV. 4. Laboreo de conservación en una parcela de regadío.	68
IV.5. Índices de calidad aplicados en fincas comerciales.	69

V. PUBLICACIONES CIENTIFICAS **73**

V.1. Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in sw, Spain: effect on soil quality. <i>Melero, S., Panettieri, M., Madejón, E., Gómez Macpherson, H., Moreno, F., Murillo, J.M., 2011. Soil & Tillage Research 112, 107–113.</i>	75
V.2. Moldboard plowing effects on soil aggregation and soil organic matter quality assessed by ¹³ C CPMAS NMR and biochemical analyses. <i>Panettieri, M., Knicker, H., Berns, A.E., Murillo, J.M. and Madejón, E., 2013. Agriculture Ecosystem and Environment 177, 48–57.</i>	85

V.3. Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence farm under different tillages evaluated by enzymatic activities and ¹³ C CPMAS NMR. <i>Panettieri, M., Knicker, H., Murillo, J.M., Madejón, E., Hatcher, P.G.. Biogeochemistry, Submitted Article.</i>	97
V.4. Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage. <i>Panettieri, M., Lázaro, L., López-Garrido, R., Murillo, J.M. and Madejón, E., 2013. Soil and Tillage Research 133, 16-24.</i>	117
V.5. Effect of permanent bed planting combined with controlled traffic on soil chemical and biochemical properties in irrigated semi-arid Mediterranean conditions. <i>Panettieri, M., Carmona, I., Melero, S., Madejón, E. and Gómez-Macpherson, H., 2013. CATENA 107, 103-109.</i>	129
<u>VI. DISCUSIÓN</u>	139
VI.1. Discusión general.	141
VI.2. Efectos de una labor agresiva sobre un suelo erosionable previamente cultivado bajo no-laboreo.	143
VI.3. Relación temporal entre actividades enzimáticas y degradación de la materia orgánica en un suelo bajo distintos sistemas de laboreo: estudio de una cronosecuencia.	147
VI.4. Laboreo de conservación y uso de herbicidas: influencia del glifosato sobre los bioindicadores de calidad del suelo.	154
VI. 5. Laboreo de conservación en una parcela de regadío.	156
Vi.6. Índices de calidad aplicados en fincas comerciales.	155
<u>CONCLUSIONES</u>	159
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	169

Summary

The present Thesis work has been carried out in order to evaluate how the application of conservation agriculture could provide benefits to soil quality in different scenarios. The aim of this work was to establish how the parameters analyzed could be used as indexes of soil quality and which of these are the most appropriate and viable for experimental and commercial farms under Mediterranean conditions. To reach this objective, chemical and biochemical parameters were analyzed on different types of soil samples, such as bulk soil at different depths, aggregate fractionated soil, density fractionated soil, and chemically extracted humic and fulvic samples. Furthermore, a deeper characterization of soil organic matter was obtained by new techniques of solid state ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrometry and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.

The central body of this manuscript consists of five peer-reviewed publications that investigate different aspects of the application of conservation tillages in farms situated in Andalucía, SW of Spain.

The first two papers were written in order to elucidate the effects of sporadic tillage operation on a farm previously cultivated under no-tillage (NT) and characterized by a high erosion risk. Moldboard plow revealed a strong tendency to deplete soil organic carbon pools and enzymatic activities at short term; it disrupted soil macro-aggregates and produced great erosion damages, whereas chisel plow did not show the same trend. Solid state NMR analyses revealed that TT plots contained a more degraded SOM if compared with RT and NT samples. Overall, moldboard plow revealed to be an unsuitable option for erodible soils under no-tillage in case sporadic tillage is required. Instead, chisel plow seemed to be a reasonable decision in those cases.

The third paper of this Thesis work (included as submitted article) is an evaluation of how biochemical parameters respond to changes originated by tillage after different times of establishment. These parameters are often used as fast responding soil quality indexes, whereas total organic carbon and other labile fractions of soil carbon are reliable at mid- and long-term. To assess this, three different tillage comparison experiments established in a farm in Coria del Río (Seville, Spain) at three different times (21, 8 and 4 years before the analyses) were

evaluated. Five different enzymatic activities were evaluated but only two of them, β -glucosidase and alkaline phosphatase, showed significant differences between conservation treatments (RT and NT) and corresponding TT plots in all three comparisons experiments of surface (0-5 cm) samples. Furthermore, total organic carbon (TOC) and labile carbon fraction were analyzed, and, as expected, TOC did not show differences at short term, and water soluble carbon and microbial biomass carbon showed a high variability.

NMR analyses for bulk soil showed a high aromatic intensity, probably black carbon, for TT samples of mid- long-term experiments that were subjected to residues burning in the past. Moreover, particulate organic matter samples revealed that NT and RT treatments increased the SOM content of O-alkylic compounds coming from fresh residues, whereas TT samples contained a SOM of a more degraded status.

Since herbicides could interact with the soil microbial community, the comparison between tillage treatments that require herbicide application could lead to data misinterpretation, if biochemical parameters are used as soil quality indexes. The fourth paper evaluates the effect of glyphosate application on soil biochemical properties. Two different experiments were carried out on an Entisol soil from the experimental farm situated in Coria del Río, Seville (Spain): the first on incubated soil pots and the second under on-field conditions. In the incubation experiment, glyphosate acted as a source of nutrients and highly enhanced values of enzymatic activities and microbial biomass carbon and nitrogen if compared with control pots. The priming effect that increased the rate of SOM degradation lasted up to several days after application. For the on-field conditions experiment, the effects of glyphosate were less evident, probably because of meteorological conditions and/or leaking and wind dispersion of the herbicide. Clearly glyphosate can cause stimulation of biochemical parameters and for this reason it is recommendable to leave an interval of at least 30 days between herbicide application and soil sampling.

The fifth paper of this Thesis evaluates the benefits that conservation agriculture originated on soil biochemical properties in an irrigated farm located in Córdoba, Spain. The conventionally tilled bed (CB) system was compared to a permanent bed system (PB) with residues retained at surfaces. The effect of wheel traffic due to the use of machinery was also analyzed. Results showed that PB improved soil quality in furrows, but not in bed, since the residues tended to roll and accumulate in

furrows and this became the most adequate zone for sampling. Furthermore, traffic produced compaction of furrows that sustained the weight of the machinery, but no significant differences in biochemical properties were found. Some of the enzymatic activities analyzed, such as β -glucosidase, also confirmed to be viable soil quality indexes for irrigation agriculture.

In order to understand how much scientific knowledge is transferred to commercial agriculture, two of the most reliable soil quality indexes (β -glucosidase and total organic carbon) were evaluated in 20 commercial farms in five different geographic areas of Andalucía. Some positive results, such as the discontinuation of the use of moldboard, are being achieved, but in many cases, the correct application of conservation agriculture practices is still far from becoming a reality and it complicated the evaluation of soil quality indexes. Further research is needed in this field.

Resumen

El presente trabajo de Tesis se ha desarrollado para evaluar cómo la implementación de la agricultura de conservación puede mejorar la calidad del suelo en diferentes escenarios. El principal objetivo del estudio pretende conocer cuáles de los parámetros analizados pueden ser utilizados como índices fiables de calidad del suelo tanto en parcelas experimentales como en fincas comerciales, bajo condiciones Mediterráneas. Para ello se analizaron parámetros químicos y bioquímicos en diferentes muestras de suelo, tanto en suelo masivo, a diferentes profundidades, como en fracciones de agregados de suelo por tamaño y densidad y muestras de ácidos húmicos y fúlvicos. Además, se obtuvo una caracterización más precisa de la materia orgánica (MO) del suelo mediante técnicas de alta resolución de espectrometría de resonancia magnética nuclear de ^{13}C de estado sólido y espectrometría de masas de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier.

El grueso del estudio lo constituyen cinco publicaciones científicas que abordan diferentes aspectos derivados de la aplicación del laboreo de conservación tanto en parcelas experimentales como en fincas comerciales de Andalucía Occidental.

Los dos primeros trabajos se centraron en el estudio de los efectos de una labor intensiva ocasional, en una finca previamente cultivada bajo no-laboreo (NL) y caracterizada por un elevado riesgo de erosión. El arado de vertedera (laboreo tradicional, LT) ocasionó, a corto plazo, una fuerte disminución de los contenidos de distintas fracciones de carbono orgánico y actividades enzimáticas del suelo; esta práctica produjo una ruptura de los macro-agregados del suelo y favoreció la aparición de grandes cárcavas, mientras que el “chisel” (laboreo reducido, LR) no ocasionó ningún daño. Los análisis de RMN de estado sólido mostraron que las parcelas bajo LT contenían una MO más degradada que las parcelas bajo NL y LR.

En general, la vertedera demostró ser una opción inviable para suelos erosionables cultivados bajo NL en el caso de que fuese necesaria una labor esporádica. En su lugar, el arado de “chisel” parece ser una decisión más razonable en estos casos.

La tercera publicación se centra en la evaluación temporal de la respuesta de los parámetros bioquímicos a los cambios originados por el laboreo. Estos parámetros son usados como índices de calidad de respuesta rápida, mientras que el carbono orgánico total y otras fracciones lábiles de carbono son más fiables a medio y largo plazo. Para estudiar este aspecto, se realizaron tres ensayos diferentes, de distinta antigüedad (21, 8 y 4 años), en la finca experimental de Coria del Río (Sevilla, España), en los que se compararon tres tipos de laboreos (NT, LR y LT). Se evaluaron cinco actividades enzimáticas, pero solo dos de ellas, β -glucosidasa y fosfatasa alcalina, mostraron diferencias significativas en superficie (0-5 cm) entre los tratamientos de conservación (NL y LR) y las correspondientes parcelas bajo LT de todos los ensayos. Además, se analizó el carbono orgánico total (COT) y sus fracciones más lábiles; como era de esperar, el COT no mostró diferencias significativas a corto plazo, mientras que el carbono hidrosoluble y determinadas actividades enzimáticas presentaron una elevada variabilidad.

Los análisis de RMN de las muestras de suelo masivo confirmaron que las muestras de LT de los experimentos a medio y largo plazo se caracterizaron por un elevado contenido en compuestos aromáticos, consecuencia de la quema de residuos llevada a cabo en el pasado. Las muestras de materia orgánica particulada revelaron que NL y LR aumentaron la cantidad de compuestos *O*-alquílicos procedentes de los residuos del cultivo, mientras que el LT presentó una MO más degradada.

Dado que los herbicidas pueden interactuar con la comunidad microbiana del suelo, la comparación entre tratamientos que requiere la aplicación de estos compuestos, con los que prescinden de su utilización, puede llevar a una interpretación errónea de los resultados, si los parámetros bioquímicos se utilizan como índices de calidad. El cuarto artículo presenta los resultados obtenidos a la hora de evaluar el efecto que el glifosato puede tener en las propiedades bioquímicas del suelo. Se realizaron dos experimentos diferentes utilizando el suelo Entisol de la finca experimental de Coria del Río (Sevilla) ya utilizado en el experimento del tercer artículo: el primero sobre muestras de suelo incubadas y el segundo en condiciones de campo. En el ensayo de incubación, el glifosato actuó como una fuente de nutrientes, aumentando los valores de las actividades enzimáticas y del carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana, en comparación con los controles sin glifosato. Este efecto “priming”, que aumentó la tasa de degradación de la MO, perduró varios días tras la aplicación. En el ensayo de campo, los efectos fueron menos evidentes, probablemente a causa de las condiciones meteorológicas y/o percolación y dispersión por parte del viento del herbicida. Resultó evidente que el glifosato puede estimular determinados parámetros bioquímicos, por lo que se recomienda dejar un periodo de al menos 30 días entre la aplicación del herbicida y el muestreo del suelo si se quieren obtener índices bioquímicos de calidad fiables.

El quinto artículo de este trabajo de Tesis evaluó los beneficios derivados de la agricultura de conservación en las propiedades bioquímicas de una finca cultivada en regadío, situada en Córdoba. Los lomos convencionales, labrados cada año, se compararon con un sistema de lomos permanentes con retención de residuos en superficie. Se analizó también el efecto del pase de las ruedas de la maquinaria sobre los surcos. Los resultados mostraron que el sistema de lomos permanente mejoró la calidad del suelo en los surcos, donde los residuos tienden a acumularse, siendo así la zona de muestreo más aconsejable que los lomos. Además, se produjo una compactación del suelo de los surcos sujetos al tráfico de la maquinaria, aunque no se encontraron diferencias significativas en las propiedades bioquímicas. Algunas de las actividades enzimáticas, como la β -glucosidasa, confirmaron ser índices fiables de calidad del suelo también en la agricultura de regadío.

Para valorar el nivel de transferencia de conocimientos científicos a la agricultura comercial, se evaluaron dos de los índices de calidad más fiables (β -glucosidasa y carbono orgánico total) en 20 fincas comerciales de Andalucía situadas en cinco

áreas distintas de cercanía geográfica. Se obtuvieron algunos resultados prometedores, como comprobar la casi total desaparición de la vertedera, pero en muchos casos, resultó evidente que no se aplica correctamente el laboreo de conservación, lo que dificultó enormemente la evaluación de la validez de los índices seleccionados a nivel comercial. Es necesario seguir abordando estos aspectos en futuros estudios.

I. Introducción

I.1. EL LABOREO EN AGRICULTURA: DEFINICIÓN, FINALIDAD Y TIPOS

Una de las etapas más importante del progreso de las sociedades humanas fue la transformación de la economía de caza, pesca y recolección en una economía agrícola y ganadera. Ya en la prehistoria, varias culturas comenzaron a cultivar cebada y trigo alcanzando una mayor disponibilidad de alimento y una mejoría de sus propias condiciones de vida, lo que permitió la sedentarización de las sociedades y un aumento de la densidad de población.

Cada avance en las técnicas de cultivo se ha traducido en un desarrollo importante de la humanidad. En varios siglos, innovaciones como los arados, el regadío, las rotaciones de cultivo y los abonos permitieron un aumento constante de la disponibilidad de alimento y, consecuentemente, un aumento de la población.

Desde la mitad del siglo pasado, el desarrollo de abonos químicos y la mecanización de la agricultura condujeron a la “revolución verde”, con un crecimiento exponencial del rendimiento de los cultivos, acompañada por una siempre mayor sobreexplotación del medioambiente (Luelmo, 1975). Datos recientes afirman que las prácticas agrícolas son responsables del 20% de las emisiones totales de gases de efecto invernadero (Lal, 2004), aspecto que no puede ser ignorado a la hora de evaluar correctamente el cambio climático global.

Hoy en día se habla frecuentemente de una “agricultura eco-sostenible”, que consiste en un aprovechamiento razonable de los recursos naturales minimizando su sobreexplotación y contaminación.

En un suelo agrícola, se define “laboreo” como el conjunto de operaciones realizadas para la modificación de la capa superficial con el fin de mejorar las condiciones de la misma y conseguir una adecuada cama de siembra y/o raíces.

En este sentido, la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (SSSA, 1987) definió el laboreo como la *‘modificación física de las propiedades del suelo con la única finalidad de producir cultivos’*.

Hoy en día es cada vez más importante considerar el suelo como un recurso que necesita ser conservado a largo plazo, tratando de mantener la calidad del mismo. Con este objetivo, la tabla I.1 fija cuales son los objetivos a corto y a largo plazo del

laboreo según Gajri *et al.* (2002), con un enfoque particular hacia la protección medioambiental.

Tabla I.1. *Objetivos del laboreo a corto y largo plazo.*

<i>Objetivos a corto plazo</i>	<i>Objetivos a largo plazo</i>
<ul style="list-style-type: none"> ❖ <i>Control de malas hierbas.</i> ❖ <i>Preparación de la cama de siembra y siembra de los cultivos.</i> ❖ <i>Modificación del régimen de agua del suelo (aumentar o reducir la infiltración; conservar el agua del suelo).</i> ❖ <i>Modificación del régimen térmico del suelo.</i> ❖ <i>Mejorar la aireación del suelo.</i> ❖ <i>Destruir capas que impidan el crecimiento de las raíces.</i> ❖ <i>Manejo de los residuos.</i> ❖ <i>Incorporación de abonos y enmiendas.</i> ❖ <i>Rotura de ‘costras’ de suelo.</i> ❖ <i>Nivelación de la tierra para irrigación.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ <i>Consecución de niveles satisfactorios en el rendimiento de los cultivos.</i> ❖ <i>Protección del medio ambiente (agua, aire, aspectos estéticos).</i> ❖ <i>Mantener/mejorar la productividad y salud del suelo (controlar problemas de degradación-erosión, salinización y compactación).</i> ❖ <i>Conservación de recursos.</i>

Las modernas tendencias de laboreo no sólo tienden a reducir la profundidad de las labores, sino también su número. A pesar de esta tendencia, todavía se distinguen tipos de laboreo muy diferentes, desde el tradicional, que consta de numerosas operaciones de manejo y una mayor profundidad, hasta la siembra directa, definida “laboreo cero” o “no laboreo”. Uno de los factores que se tienen en cuenta para clasificar los tipos de laboreo es el manejo de los residuos. Según el porcentaje de la superficie de suelo que queda cubierta por restos de cultivo después de la cosecha, Gajri *et al.* (2002) establecen la clasificación que se muestra en la Figura I.1.

I.1.1. LABOREO TRADICIONAL

El laboreo tradicional (LT) se caracteriza por un elevado número de operaciones mecánicas que incluyen el volteo del suelo mediante un arado de vertedera y, posteriormente, otros tipos de labores aptas para preparar una adecuada cama de siembra. Los residuos del cultivo anterior pueden ser retirados para fines

económicos o quemados; esta última práctica está completamente prohibida en muchos países y, desde 2004, también en Andalucía. La inversión de las capas de suelo producida por la vertedera ocasiona un enterramiento del 95-100% de los residuos que quedan sobre el terreno.

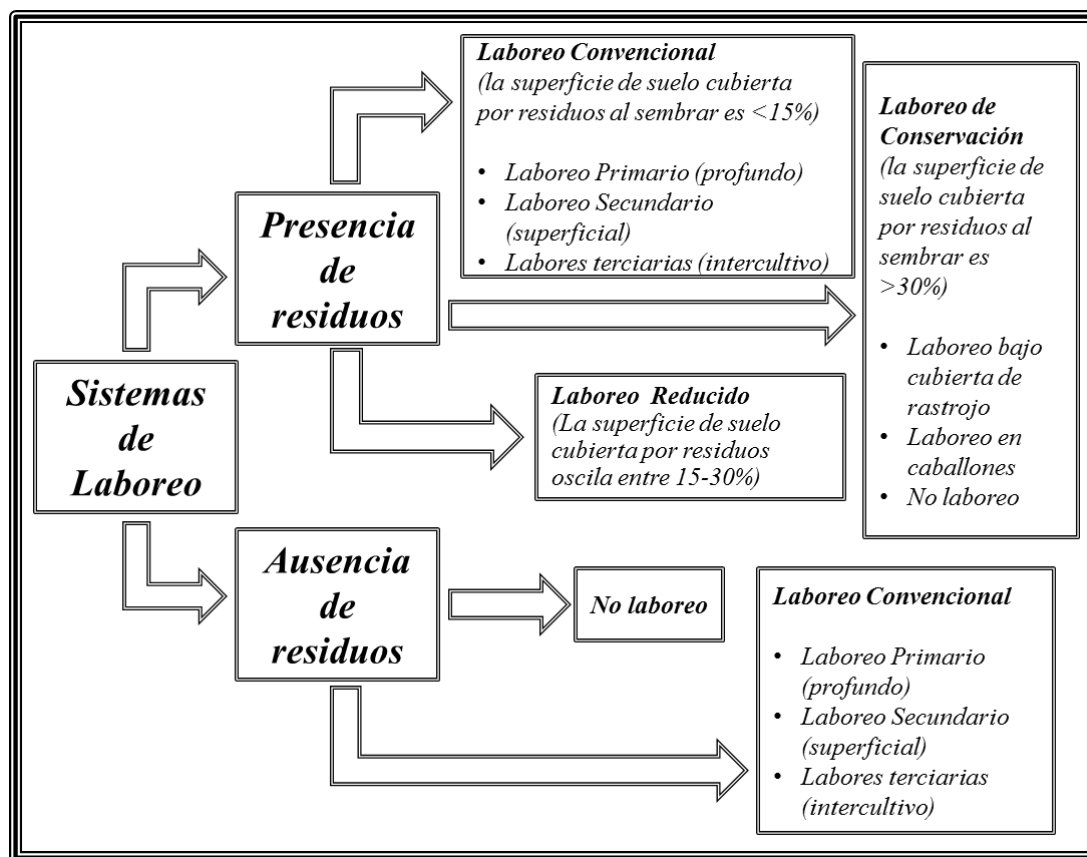


Figura I.1. Clasificación de los sistemas de laboreo según el manejo de los residuos y labores realizadas. Tomado de Gajri et al. (2002).

I.1.2. LABOREO DE CONSERVACIÓN

El laboreo de conservación (LC) presenta tres características principales: prescinde del uso de la vertedera, se reduce considerablemente el número de labores que se llevan a cabo y se establece una cubierta de residuos que cubre por lo menos el 30% de la superficie del suelo (Gajri et al., 2002).

Urbano-Terrón (1992) considera los siguientes tipos de laboreo de conservación como más frecuentes:

➤ Laboreo bajo cubierta de rastrojo (“mulch tillage”, “chisel plow”).

Se utiliza el arado chisel, arado de discos para rastrojos, subsoladores, *rippers*, e incluso fresadoras y rotoarados en zonas con mucha cubierta vegetal, o ricas en materia orgánica. Para las labores secundarias se utilizan cultivadores de brazos flexibles y distintos tipos de rastras de púas. Para el control de malas hierbas es necesario utilizar herbicidas. Esta práctica es muy efectiva para el control de la erosión del suelo, además de favorecer la infiltración (especialmente en suelos tendientes a compactarse y formar costras) y reducir la evaporación del agua.

➤ Laboreo en caballones (“ridge tillage”).

Este método suele dejar entre 50 y 60 % de residuos sin enterrar, utilizando un apero de labranza que realiza un caballón de 10 a 25 cm de altura; entre caballones se deja una banda sin labrar de 40 a 80 cm, según el marco de plantación. Se mezclan y entierran los residuos de la banda del caballón y se dejan inalterados (o se desmenuzan) los de la banda más ancha. La siembra se hace sobre el lomo del caballón (Urbano Terrón, 1992).

➤ Laboreo cero con siembra directa (“no-till”).

El laboreo cero o no laboreo (NL) implica la utilización de una sembradora capaz de hacer la siembra sobre los rastrojos, inalterados, del cultivo precedente. El escaso laboreo es el que corresponde a los instrumentos cortantes que lleva la bota de la sembradora con el objetivo de hacer una hendidura (5 a 8 cm de anchura) para depositar la semilla. En estas condiciones, suele quedar sobre la superficie del suelo no menos del 90% de los residuos del cultivo precedente.

Se trata de una técnica especialmente interesante para conservar el agua del suelo y es muy ventajosa para el ahorro de energía (combustibles, maquinaria, reparaciones, etc.). Sin embargo, suele facilitar la proliferación de malas hierbas haciendo necesario el uso de herbicidas (Urbano Terrón, 1992) y puede producir compactación y dificultad de drenaje en el subsuelo. En estos casos hay quien aboga por la aplicación de una labor cada cierto tiempo (5 a 7 años).

Según Gajri, *et al.* (2002), existe una labor intermedia entre el laboreo tradicional y el de conservación, llamado “*laboreo reducido*” donde se deja entre el 15-30 % de

la superficie del suelo cubierta por residuos. Por las labores que se llevan a cabo (chisel o grada y ausencia de volteo del suelo), en el caso de que la superficie cubierta por residuos supere el 30%, podría englobarse como otra modalidad del laboreo de conservación.

I.2. LABOREO DE CONSERVACIÓN vs. LABOREO TRADICIONAL

I.2.1. PROBLEMÁTICA DEL LABOREO TRADICIONAL

La cada vez mayor disponibilidad de herramientas modernas y mecanizadas ha influido enormemente en el desarrollo de nuevas técnicas de labranza, facilitando la consecución de los tres fines básicos del laboreo: obtener un lecho de siembra adecuado, controlar las malas hierbas y evitar la compactación del suelo.

En el siglo XI, uno de los mayores avances en este tema fue la utilización del arado de vertedera. Hoy en día queda claro que su abuso provoca problemas de tipo económico y medio ambiental, pero sigue siendo utilizado en vastas áreas (García Torres y González Fernández, 1997; Magdoff y Weil, 2004).

El uso excesivo de maquinaria se traduce en un gasto importante de combustible y tiempos operativos, además de la problemática que supone el deterioro de la propia maquinaria (Urbano Terrón, 1992).

A nivel agro-medioambiental, el laboreo excesivo puede originar:

- Incremento de la evaporación y, en consecuencia, desecación de los horizontes del suelo labrado.
- Degradación de la estructura del suelo, como la rotura de agregados debido al laboreo continuado y el paso de la maquinaria.
- Una mayor erosión debida a la producción de tierra fina y a la ausencia de los residuos de vegetación, que favorecen la acción destructora de los agentes erosivos (viento y agua principalmente)
- Una posible compactación del suelo que puede resultar en las temidas suelas de labor, debida al paso frecuente de maquinaria y aperos de labranza.
- Reducción del contenido de materia orgánica del suelo.
- Lavado y disminución de micronutrientes, macronutrientes y agua, debidos a escorrentía causada por la pérdida de la estructura.

I.2.2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL LABOREO DE CONSERVACIÓN

Como regla general, cualquier sistema de laboreo deberá adaptarse a las condiciones específicas de suelo y clima de cada escenario en particular, de modo que un mismo sistema de laboreo de conservación puede ir bien para un determinado tipo de suelos, y clima, y no proporcionar resultados satisfactorios en otros suelos (Moreno *et al.*, 1997).

En el suroeste de España, bajo clima Mediterráneo o semi-árido, los suelos agrícolas suelen caracterizarse por unos bajos contenidos de materia orgánica y son propensos a procesos de erosión por pérdida de la capa arable. Bajo estas condiciones, el uso indiscriminado de la vertedera puede reducir aún más su erosión y calidad. Debido a estos problemas, se pretende que el agricultor aplique sistemas de laboreo de conservación, ya que aplican técnicas de manejo de suelo que hacen sostenibles las actividades productivas de los agricultores, contribuyendo al mantenimiento y recuperación de los recursos naturales suelo, agua y aire.

Se pueden distinguir dos tipos diferentes de ventajas relacionadas con la agricultura de conservación: a corto plazo, el laboreo de conservación produce sobre todo ventajas de tipo económico (ahorro de energía), mientras que a largo plazo produce ventajas de tipo medio ambiental, mejorando la calidad del sistema suelo-agua-planta y preservando sus características.

I.2.2.1. VENTAJAS TÉCNICO-ECONÓMICAS

La disminución del número de las operaciones que se llevan a cabo en el laboreo de conservación implica un ahorro de combustible y de horas de trabajo, una menor compactación del suelo debida al paso de la maquinaria sobre el mismo (Plaster, 1992), menor número de herramientas y aperos utilizados y menor riesgo de avería de la maquinaria, aspectos que se traducen en un ahorro inmediato de dinero por parte de los agricultores (Gil Ribes, 1997).

Bajo condiciones Mediterráneas o semi-áridas, la presencia de una capa de residuos en superficie evita pérdidas de agua por evaporación, lo cual puede incidir muy positivamente sobre las cosechas. Este aspecto ha sido exhaustivamente estudiado bajo nuestras condiciones de suelo y clima por Moreno *et al.* (1997; 2005), y en otras zonas españolas de clima semi-árido (Álvaro-Fuentes *et al.*, 2007; Lampurlanés y Cantero-Martínez, 2006; López y Arrúe, 1997)

1.2.2.2. VENTAJAS AMBIENTALES (CALIDAD: ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS)

➤ Mejoras en la biodiversidad.

Una de las principales ventajas ambientales que suele atribuirse al laboreo de conservación es su **impacto positivo sobre la biodiversidad del medio**, tanto a nivel edáfico como ecosistémico (López-Fando y Bello, 1997; Kladivko, 2001). En general, tanto la microflora como la micro, meso y macrofauna se ven favorecidas por la reducción del laboreo, siendo los organismos mayores muy sensibles a los cambios de intensidad del laboreo.

Además, numerosos estudios han reflejado importantes **aumentos de la biomasa microbiana** asociados a la reducción del laboreo y permanencia, o ligera incorporación, de residuos en superficie. Paralelamente, también se han detectado importantes **aumentos de diversas actividades enzimáticas** (Alvear *et al.*, 2005; Angers *et al.*, 1993; Cochran *et al.*, 1994; Dick, 1994)

Bajo clima Mediterráneo, también se han obtenido resultados positivos en este sentido (Álvaro-Fuentes *et al.*, 2013; Madejón *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2005; Murillo *et al.*, 2006)

➤ Mejora de parámetros físico-químicos.

En el laboreo de conservación, numerosos parámetros físicos dependientes de la estructura del suelo pueden verse influenciados por la presencia de residuos del cultivo precedente. Entre ellos la densidad aparente, distribución del tamaño de poros, estabilidad de los agregados y sellado y aparición de costras en los suelos. El laboreo intensivo, con pulverización e inversión de suelos acaba por deteriorar profundamente la estructura de los mismos. Por el contrario, sistemas menos agresivos como el laboreo de conservación, especialmente en su modalidad de no laboreo, aumentan el carbono orgánico y mejoran la estructura (Arshad *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1997 y 2006; Murillo *et al.*, 1998 y 2004; Bradford y Peterson, 2000, Mrabet, 2002; Franzluebbers, 2002 y 2004; Martens *et al.* 2005).

En general la **densidad aparente** de la capa superficial del suelo tiende a aumentar bajo laboreo de conservación (especialmente bajo no laboreo), mientras

que los macroporos y la conductividad hidráulica a saturación tienden a disminuir (Gajri *et al.*, 2002). No obstante pueden producirse variaciones dependiendo de las condiciones particulares de cada escenario.

Por otra parte, la mayor acumulación de carbono orgánico en el suelo determina la aparición de mayores valores de **capacidad de cambio**, ya que se trata de una variable que depende básicamente del contenido de materia orgánica y arcilla (Horne *et al.*, 1992; Gajri *et al.*, 2002; Franzluebbers, 2004).

El aumento de materia orgánica que supone la presencia de residuos de cultivos en el suelo produce también un aumento de fertilidad química, especialmente en la capa superficial, donde quedan concentrados los residuos y nutrientes que éstos aportan (Magdoff y Weil, 2004).

Además de mejoras físico-químicas directas, introducidas por el laboreo de conservación sobre la calidad del suelo, indirectamente, la presencia de residuos también aumenta la calidad del suelo evitando en gran medida su **erosión**, causada tanto por el viento (López *et al.*, 1998, 2000 y 2001; Gomes *et al.*, 2003), como por el agua interceptando la energía de las gotas de lluvia y el arrastre de suelo por **escorrentía** (Giraldez Cervera, 1997; Martínez Raya y Francia Martínez, 1997).

Las labores profundas ocasionan, de forma inmediata, mejoras en las condiciones de infiltración de agua en los suelos, pero también es cierto que la aparición de costras puede limitar prontamente, y seriamente, estas mejoras. Por el contrario, la cubierta de residuos que caracteriza al laboreo de conservación suele evitar la aparición de estas costras tras lluvias intensas o tormentas, al tiempo que ralentiza la escorrentía en zonas con cierta pendiente, intensificando así la infiltración y limitando la erosión del suelo.

Aparte de las mejoras observadas en la fertilidad física de los suelos, especialmente en su estrato superficial, son muchos los trabajos que reflejan la mayor estabilidad y tamaño de los agregados estables al agua bajo laboreo de conservación, atribuyéndose estas mejoras a la mayor concentración de materia orgánica que se produce en superficie (Douglas y Goss, 1982; Lal, 1989; Blevins y Frye, 1993; Franzluebbers, 2004).

Además, el laboreo de conservación reduce la evaporación del agua, aunque Bond y Willis, (1969) hayan detectado que este efecto protector puede durar solo a corto plazo. La suma de las mejoras producidas en la estructura, en la disponibilidad

de nutrientes superficiales y en el almacenamiento de agua hace que los cultivos de secano puedan soportar mejor una situación de estrés, de manera que si el cultivo tiene suficiente disponibilidad de nutrientes, N especialmente, suelen obtenerse mejores cosechas bajo laboreo de conservación (Phillips *et al.*, 1980; Blevins y Frye, 1993).

Aunque bajo condiciones áridas y semi-áridas uno de los principales objetivos del laboreo de conservación sea evitar la degradación de los suelos y conservar el agua (Unger y McCalla, 1980), si alguno de los factores mencionados perjudicase el rendimiento de los cultivos, la implantación de esta técnica podría verse muy comprometida.

No obstante, numerosos estudios (Silgram y Shepherd, 1999; Warkentin, 2001) han comprobado que cuando las técnicas de laboreo de conservación, incluido el no-laboreo, se aplican apropiadamente en suelos, y cultivos, adecuados para ello, los rendimientos no tiene porqué ser más bajos que los obtenidos bajo laboreo tradicional. A largo plazo resultan incluso superiores en muchos casos (Lal, 1989; Moreno *et al.*, 1997; Wuest *et al.*, 2000; Hooker y Vyn, 2000).

➤ Calidad del agua.

El laboreo puede afectar a la calidad del agua, tanto superficial como infiltrada, mediante diversos mecanismos.

En general el laboreo puede aumentar el tiempo de contacto agua/suelo así como la infiltrabilidad, reduciendo al mismo tiempo la velocidad de flujo del agua de escorrentía, lo que se traduce en una disminución de la erosión debido a su menor fuerza de arrastre.

La disminución de la erosión supone una disminución paralela de la dispersión de sedimentos que, potencialmente, pueden transportar contaminantes como biocidas (herbicidas preferentemente), nitratos, fosfatos, metales, etc, y contaminar así otras aguas superficiales y subterráneas.

Por consiguiente, elegir el tipo de laboreo de conservación adecuado, puede traducirse en una menor pérdida de suelo en zonas erosionable, disminuyendo los efectos de los agentes erosivos y la contaminación de áreas cercanas.

➤ Calidad del aire.

El laboreo puede influir en la calidad del aire a través de la emisión de gases que aumentan el efecto invernadero, como consecuencia de los cambios biofísicos que se producen en el suelo. El Panel Intergubernamental para el estudio del Cambio Climático (IPCC, 1995) ha estimado que el 20% del aumento del efecto invernadero está relacionado con actividades agrícolas.

Los suelos agrícolas, debido a las reacciones químicas, bioquímicas y físicas que se desarrollan en ellos, pueden emitir, básicamente, CO₂, óxido nitroso (N₂O) y metano (CH₄). La propia maquinaria, especialmente cuando no está en buen estado, puede también emitir gases, emisiones que serán más altas bajo laboreo tradicional ya que requiere un número mayor de labores de campo y consume una cantidad mayor de combustible. Una agricultura, para ser definida sostenible, debe reducir al mínimo la emisión a la atmósfera de gases con efecto invernadero (Gajri *et al.*, 2002).

La emisión de CO₂ es especialmente alta en parcelas bajo laboreo tradicional inmediatamente después de las labores, comparada con la registrada en parcelas bajo laboreo de conservación. Se trata de una emisión puramente física ocasionada por la brusca alteración de la estructura del suelo que ocasiona la vertedera. Pero además de esta inmediata liberación de CO₂, a largo plazo también aumenta la emisión de este gas debido a la mayor exposición de suelo a la acción microbiana ocasionada por el laboreo tradicional. En un experimento realizado bajo nuestras condiciones de suelo y clima, pudo comprobarse que en parcelas donde se aplicó la vertedera (laboreo tradicional, LT) se liberaron a la atmósfera alrededor de 100-150 gramos más de CO₂ por metro cuadrado y año que en parcelas bajo laboreo de chisel o de siembra directa (López-Garrido *et al.*, 2009).

Varios autores observaron, en diferentes suelos y diferentes zonas climáticas, un aumento análogo de las emisiones de N₂O y CH₄ en parcelas bajo LT comparado con las emisiones medidas bajo laboreo de conservación (Ball *et al.*, 1999; Kessavalou *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1996).

1.2.3. DESVENTAJAS DEL LABOREO DE CONSERVACIÓN

Aunque esta técnica de laboreo tenga como principal objetivo evitar la degradación de los suelos, y conservar el agua (Unger y McCalla, 1980), puede presentar también algunos inconvenientes:

- En suelos mal drenados, el laboreo de conservación podría agravar las desventajas de la anaerobiosis, potenciando algunas enfermedades para los cultivos producidas por organismos anaeróbicos hospedados en el suelo.
En las regiones de clima templado, la capa de residuos que se dejan en el suelo puede dilatar la germinación y primeras fases del desarrollo de los cultivos. Sin embargo, esta relativa desventaja se tornaría en beneficio en los trópicos, ‘protegiendo’ la germinación y desarrollo de las plántulas, ante las altas temperaturas existentes (Lal, 1989).
- El laboreo de conservación requiere más destreza y cuidadoso manejo que el convencional (Plaster, 1992), hasta el punto de que en ocasiones los agricultores fracasan al implantar esta técnica.
- También puede ocurrir que el suelo se compacte en exceso, especialmente bajo no laboreo, siendo entonces necesario intercalar un laboreo convencional cada cierto tiempo (o alguna labor superficial, si se trata de suelos fácilmente erosionables), práctica igualmente necesaria cuando proliferan ciertas plantas perennes de difícil erradicación.
- El principal inconveniente que presenta el laboreo de conservación, es sin lugar a dudas la mayor cantidad de herbicidas que exige, sobre todo en la modalidad de no laboreo, cuyas posibles consecuencias, desde un punto de vista medio-ambiental, no son conocidas en su totalidad, por el momento.

Para solucionar en parte estos problemas, especialmente los derivados de una posible compactación del suelo bajo no-laboreo, algunos agricultores utilizan

ocasionalmente labores de vertedera o de chisel (es frecuente una periodicidad que oscila entre los 7 y 10 años).

I.3. ÍNDICES DE CALIDAD DEL SUELO

Uno de los aspectos fundamentales que se pretende abordar en este trabajo de tesis, es el establecimiento de índices de calidad del suelo, que permitan conocer el éxito alcanzado por distintos sistemas de laboreo de conservación en cada una de las situaciones edafo-climáticas estudiadas. Así como resultan claras las ventajas que pueden derivarse del laboreo de conservación, no hay un consenso unánime respecto a que parámetros del suelo son los que pueden reflejar mejor el aumento de calidad del mismo.

I.3.1. MATERIA ORGÁNICA Y FRACCIONES DE CARBONO ORGÁNICO DEL SUELO.

Cuando se trata de valorar los cambios que produce el laboreo en la calidad del suelo, el carbono orgánico total (COT) o la materia orgánica (MO) son los parámetros más utilizados. En cuanto a la calidad de los suelos asociada a la materia orgánica, suele argumentarse que la intensa oxidación de esta última en condiciones semi-áridas y Mediterráneas limita su acumulación en superficie. Pero es un aspecto que no siempre se enfoca debidamente. La idea de “mientras más mejor”, referida al carbono orgánico total de suelos agrícolas, no tiene mucha consistencia en términos de productividad (Sojka y Upchurch, 1999). Más que definir un valor máximo de COT, habría que conocer qué contenido, y sobre todo qué fracciones del mismo, son las más adecuadas para mantener la calidad de un suelo (Sparling *et al.*, 2003). Además, en climas áridos o semi-áridos, la simple determinación del COT podría no ser un buen indicador de las mejoras introducidas por el laboreo de conservación, dado que este parámetro suele tener unos tiempos de respuesta a más largo plazo, siendo necesario establecer nuevos índices de calidad que caractericen tanto el estado bioquímico del suelo como la calidad de su materia orgánica a más corto plazo.

Un seguimiento orientado a conocer la evolución que puede experimentar la materia orgánica de suelos sometidos a distintos tratamientos, no sólo debería

contemplar el COT, sino también las fracciones del COT más lábiles, exponentes de la ‘actividad biológica’, aspecto importante ya que constituyen una ‘alerta temprana’ (‘early alert’) de los cambios, más inmediatos, que puede estar experimentando la materia orgánica de un suelo (Oyonarte *et al.*, 2007).

Las fracciones lábiles de carbono no sólo tienen gran influencia en la dinámica y mineralización de nutrientes, sino también en la formación de agregados, y, por consiguiente, en la estructura del suelo; se trata de unas fracciones muy sensibles al manejo de los suelos, por lo que su análisis bajo distintos escenarios edafo-climáticos y de manejo puede resultar muy útil para valorar las posibles mejoras introducidas por el laboreo de conservación (Álvaro-Fuentes *et al.*, 2008a y b; Álvaro-Fuentes *et al.*, 2009; Cantero-Martínez *et al.*, 2006; Madejón *et al.*, 2009). Este trabajo de tesis se ha centrado en la evaluación de alguna de estas fracciones, como el carbono hidrosoluble y el “carbono activo” o, según la definición de Culman *et al.* (2012) “Permanganate Oxidizable Carbon, (POxC)”; Oyonarte *et al.* (2007) comprobaron la idoneidad del denominado POxC como índice de calidad aplicable a suelos áridos de nuestra Península.

Esto no quiere decir que deba excluirse el seguimiento del COT en todos los escenarios a estudiar, ya que según se ha indicado, es un exponente de la influencia que tienen, a medio y largo plazo, tratamientos más agresivos del suelo. Se trataría simplemente de conocer qué porcentaje suponen las fracciones lábiles de carbono orgánico para un nivel determinado de COT, en función de la duración, escenario y tipo de labores aplicadas al suelo.

I.3.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Numerosos estudios han evidenciado que el metabolismo de la comunidad microbiana del suelo se ve afectado por los cambios originados por el laboreo, llegando a proponer los valores de actividad enzimática, la respiración celular y la cuantificación del carbono y del nitrógeno que componen la biomasa microbiana, entre otros, como índices de calidad del suelo a corto plazo (Melero *et al.*, 2008; Nannipieri, 1994).

Ahora bien, la rápida respuesta a corto plazo demostrada por los parámetros bioquímicos puede conllevar problemas de elevada variabilidad y dispersión de

datos debido a las condiciones climáticas, a la utilización de agroquímicos o al tipo de cultivo y de exudados radicales, afectando la significación estadística de los resultados (Feng *et al.*, 2003). Además, los laboreos de conservación conllevan la necesidad de utilizar algún tipo de herbicida, moléculas que han demostrado poder afectar los valores de actividad enzimática (Gianfreda y Rao, 2008; Reinecke *et al.*, 2002; Zabaloy *et al.*, 2008) pudiendo introducir sesgos a la hora de compararlos con otros tipos de laboreo, como el LT que, generalmente, no requiere ningún tipo de herbicida.

La gran variedad de enzimas intracelulares y extracelulares presentes en el suelo ofrece una vasta gama de oportunidades para evaluar distintos aspectos del metabolismo microbiano y de los ciclos de degradación de la MO y de los nutrientes en el suelo. Los enzimas intracelulares suelen tener un nivel de actividad proporcional al número de microorganismos vivos en el suelo, mientras que los exoenzimas suelen presentar una estructura adaptada a mantener sus funciones en el exterior de la célula y pueden permanecer en el suelo por más tiempo y resistirse a la degradación, por lo que su nivel de actividad suele ser independiente del número de microorganismos activos (Nannipieri y Smalla, 2006; Nannipieri, 1994).

En este trabajo de tesis se han evaluado los niveles de varias actividades relacionadas con la oxidación de los compuestos orgánicos (deshidrogenasa, DHA), con la hidrólisis de los enlaces glucosídicos típicos de los residuos celulósicos (β -glucosidasa, β -glu), con el metabolismo de las formas orgánicas de fosfatos (fosfatasa alcalina, PA) y sulfatos (arilsulfatasa, AS), así como con la hidrólisis de enlaces peptídicos (proteasa, PR), tratando de relacionar los resultados con los efectos del laboreo, de su interacción con productos herbicidas y la degradación de las fuentes de carbono orgánico proporcionadas por los residuos de cultivo. Paralelamente se evaluaron los contenidos de carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana (CBM y NBM), que permiten hacer una cuantificación de la población microbiana presente en el suelo.

En relación con el carbono, es importante conocer, bajos distintos escenarios edafo-climáticos y de manejo, la relación CBM/COT. El aumento de esta relación, para un determinado nivel de COT, se relaciona con mejoras de la biomasa microbiana del suelo (Lavahun *et al.*, 1996).

I.3.3. SUELO MASIVO Y F RACCIONAMIENTO POR TAMAÑO, DENSIDAD Y ESTRUCTURA QUÍMICA.

Además de la cuantificación de los parámetros químicos y bioquímicos, es importante establecer cómo se distribuyen en el perfil del suelo a diferentes profundidades, cómo se adhieren a la fracción mineral fina del suelo (limo + arcilla) y qué relación tienen con los micro y macro-agregados presentes en el mismo. Por eso, se analizaron las razones de estratificación de los distintos parámetros estudiados, o sea la razón entre sus valores en superficie y profundidad, dado que las mejoras en la calidad del suelo superficial se convierten en un beneficio mayor para la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas (Franzluebbers, 2002a). Asimismo se procedió al fraccionamiento por tamaño de agregados y por densidad física para profundizar en los conocimientos sobre el proceso de acumulación y degradación de la MO del suelo.

En este sentido, la estabilidad de los agregados, y su relación con distintas variables del suelo, estudiada en función de la duración y tipo de labores aplicadas en cada escenario en particular, también constituye un índice de calidad de suelo de gran importancia para evaluar el éxito de una determinada técnica de laboreo (Álvaro-Fuentes *et al.*, 2009; Jastrow, 1996; Six *et al.*, 1999). Conviene tener en cuenta que aunque la estabilidad de los microagregados puede estar más relacionada con el contenido de arcilla, y la de macroagregados con el contenido de materia orgánica (Amézketa, 1999; Bronick y Lal, 2005; Plaza-Bonilla *et al.*, 2010), por debajo de un valor ‘umbral’ de materia orgánica, la estabilidad de los agregados puede estar más relacionada con otras variables del suelo, como el contenido de carbonatos, según pudieron comprobar Boix-Fayos *et al.* (2001) en suelos españoles bajo condiciones semi-áridas a subhúmedas.

La formación de agregados de mayor tamaño se ve favorecida en suelos bajo laboreo de conservación, debido a una mayor cantidad de residuos presente en superficie y a la menor acción mecánica que provoca la ruptura y dinámica de los agregados. Six *et al.* (1998) detectaron la presencia de núcleos de residuos de cultivo parcialmente oxidados en el interior de macroagregados procedentes de suelos bajo laboreo de conservación, y la oclusión de los macroporos presentes en dichos agregados por parte de otros agregados de menor tamaño.

Dependiendo de las diferentes técnicas de tamizado que se utilicen, se obtienen diferentes tipos de agregados en seco o en húmedo. En el momento de elegir el tipo de agregados para su análisis, es importante considerar que el tamizado en húmedo puede afectar a los enlaces débiles que se establecen entre los grupos funcionales de las moléculas presentes en la materia orgánica (Schutter y Dick, 2002). Por el contrario, el tamizado en seco separa las diferentes fracciones solamente según el tamaño, manteniendo inalteradas las fuerzas que originan la agregación.

Una vez obtenidos los diferentes agregados que se pretenden estudiar, clasificados según su tamaño y densidad, es interesante conocer si los índices de calidad de suelo enumerados anteriormente, presentan diferencias significativas entre en las distintas fracciones seleccionadas. Estos experimentos pueden proporcionar datos más precisos sobre los procesos oxidativos que tienen lugar en el suelo.

Otras técnicas de extracción y separación de distintas fracciones de carbono presentes en la MO son la separación por densidad, que permite separar las fracciones de materia orgánica particulada (MOP), así como el procedimiento químico que extrae los ácidos húmicos presentes en el suelo. La MOP en su forma libre (-L) es una fracción ligera de MO, que queda flotando en una disolución a elevada densidad. Está formada en su mayor parte por restos de cultivos y compuestos lábiles como carbohidratos y proteínas. Con el paso del tiempo, esta fracción acaba siendo degradada por los microorganismos, perdiendo parte de su reactividad y convirtiéndose en moléculas más estables. A su vez, se empiezan a formar enlaces más o menos fuertes con la fracción mineral del suelo, en particular con las arcillas, definiéndose entonces esta fracción como MOP ocluida (-O); para separar la MOP-L desde la fracción mineral es necesario utilizar energía en forma de ultrasonidos o dispersantes químicos. Recientemente, Plaza *et al.* (2012) han puesto a punto un método para separar la MO presente en los micro- y macro-agregados y posteriormente han destacado la importancia de la comunidad microbiana inmovilizada en la fase mineral en el ciclo de secuestro/mineralización de carbono (Plaza *et al.*, 2013)

Como “sustancias húmicas” (SH) se define la clase de compuestos orgánicos más abundante en el suelo, los cuales derivan de la degradación de los residuos de cultivo. Aunque la estructura de estos compuestos es variable y muy difícil de

precisar, se pueden separar dos tipos principales de SH, una fracción más reactiva, soluble en ácidos fuertes y de bajo peso molecular, definida como ácidos fúlvicos (AF), y otra menos reactiva, insoluble en ácidos fuertes formada por moléculas fenólicas y carboxílicas, definida como ácidos húmicos (AH, Fig. I.2).

La tercera fracción que normalmente se incluye en la clasificación de las sustancias húmicas es la “humina”, aunque presenta pocas características comunes con las otras dos fracciones y se presenta como una serie de compuestos altamente estables y degradado. Algunos trabajos tienden a excluirla de la definición de SH y a considerarla como fase mineral (Hayes *et al.*, 2012).

Estudios recientes demostraron que la baja reactividad de los AH y de la humina es debida más a la interacción con la fase mineral y a la oclusión dentro de agregados que los protegen de la degradación microbiana que a una composición química particularmente recalcitrante (Marschner *et al.*, 2008, Dungait *et al.* 2012).

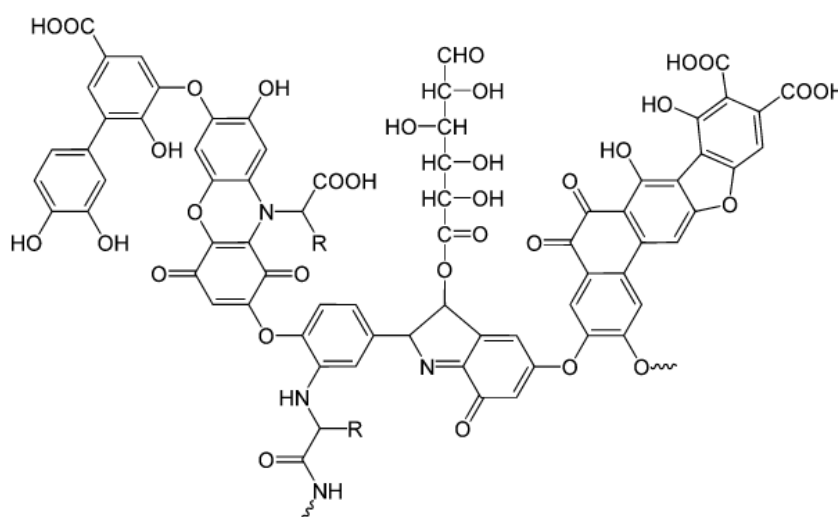


Fig. I.2. Estructura simplificada de los ácidos húmicos. (Imagen tomada de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d0/Humic_acid.svg)

Dado que la composición de las SH y MOP depende en general del tipo de MO que está presente en el suelo, es interesante comprobar si los cambios originados por el laboreo, en términos de calidad del suelo, cantidad de COT (y por consiguiente de SH) y actividad microbiológica, ocasionan algún cambio de tipo molecular de distintas fracciones de la MO del suelo, o si influyen sobre la velocidad del proceso de formación y degradación de las mismas.

1.3.4. ÍNDICES DE CALIDAD APLICADOS EN FINCAS COMERCIALES.

Una vez evaluados cuales son los índices de calidad más fiables para la comparación de laboreos en fincas experimentales, es conveniente comprobar su fiabilidad en fincas comerciales. Frecuentemente, fincas adyacentes pueden ser manejadas por los agricultores bajo distintos laboreos, aunque presentando la misma rotación de cultivos.

En esos casos es interesante averiguar cómo las distintas prácticas utilizadas pueden afectar a la calidad del suelo, teniendo en cuenta que el objetivo principal de una finca agrícola comercial es perseguir un beneficio económico y por ello se adoptan alternancias de labores y manejos de residuos diferentes de los comúnmente evaluados en fincas experimentales. Siendo claros los beneficios que el LC aporta en términos medioambientales y económicos, es fundamental valorar cómo la información científica de divulgación llega al agricultor y que sugerencias son mejor recibidas y aplicadas.

1.3.5. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS APLICADAS A MUESTRAS DE SUELO.

Para profundizar en el conocimiento de la composición molecular de la materia orgánica, varios autores utilizan técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (Berns *et al.*, 2008; Knicker, 2011) mientras que otros se centran en técnicas de espectrometría de masas (Hatcher *et al.*, 2001; Leenheer y Croué, 2003) hasta llegar al complejo instrumento de espectrometría de masas de resonancia iónica-ciclotrónica a transformada de Fourier (FT-ICR MS) (Sleighter *et al.*, 2012) que utiliza algunos principios de la resonancia magnética en la detección de iones procedentes de un espectrómetro de masas.

Brevemente, los instrumentos RMN permiten identificar núcleos atómicos mediante sus propiedades mecánico-cuánticas. Los campos magnéticos que cada átomo de la muestra posee, se orientan paralelamente al campo magnético producido por el espectrómetro. Una vez perturbado el equilibrio mediante un impulso electromagnético con dirección ortogonal, los campos magnéticos vuelven al estado de menor energía emitiendo en el campo de las radiofrecuencias con una intensidad y una frecuencia de resonancia típica de cada átomo y que depende del entorno

químico que lo rodea. Un detector recoge todas las señales emitidas y las transforma en espectros mediante la función de Transformada de Fourier.

Los instrumentos RMN son cada día más potentes y se desarrollan frecuentemente actualizaciones y piezas complementarias para satisfacer las necesidades de los laboratorios de todas las áreas de la investigación científica. Si bien esta técnica no puede ser considerada como novedosa, lo es su aplicación en muestras de suelo sólidas, gracias a las técnicas de polarización cruzada (CP) y la rotación en el ángulo mágico (MAS) (Simpson *et al.*, 2011). Aunque sea posible seguir analizando muestras de suelo o de sus fracciones mediante RMN en estado líquido, la escasa solubilidad de esas muestras en los solventes comúnmente utilizados en RMN, convierte la RMN de estado sólido en la elección preferida de muchos investigadores de la ciencia del suelo. Recientemente, el desarrollo de técnicas híbridas de RMN, denominadas RMN de alta resolución (HR-MAS NMR) donde las muestras se suspenden en una micro-cantidad de solvente y se analizan en condiciones similares a las del RMN de estado sólido, ha permitido aumentar el nivel de resolución de los espectros (Zhong *et al.*, 2011).

Sin embargo, esta técnica, tanto de estado líquido como de estado sólido, se ve afectada por la elevada heterogeneidad y complejidad de las muestras de MO que se analizan, originando líneas de resonancia anchas y superposición de los picos de los compuestos orgánicos. Por ello, resulta difícil la identificación individual de los compuestos orgánicos y se prefiere dividir el espectro en zonas espectrales pertenecientes a distintas clases de compuestos. Un análisis semi-cuantitativo es posible, efectuando una integración de estas zonas y evaluando la aportación relativa de cada zona a la intensidad total del espectro (Tabla III.1).

Entre los compuestos que más afectan a la razón entre señal adquirida y ruido de los espectros, los compuestos aromáticos condensados como el grafeno y los compuestos paramagnéticos como los óxidos de hierro, entre otros, son los más importantes. Desafortunadamente, el suelo es naturalmente rico en paramagnéticos y es necesario un tratamiento previo de las muestras de suelo masivo antes de analizarlas por RMN. Entre los métodos más comunes, los paramagnéticos se eliminan con una digestión por ácido fluorhídrico, que elimina la fracción mineral del suelo y, de manera no selectiva, parte de la MO soluble (Gonçalves *et al.*, 2003;

Knicker, 2011), o por aislamiento de fracciones de la MO que no contienen paramagnéticos, como la fracción húmica y las fracciones de MOP.

Recientemente, varios autores apuestan por analizar la MO del suelo o la MO disuelta mediante instrumentos de espectrometría de masas. Una vez más, la elevada complejidad de los compuestos que caracterizan la MO del suelo requiere una alta resolución de los detectores empleados para definir individualmente los iones presentes en mezclas de MO. La mayoría de los espectrómetros de masas no posee estas características, pero el FT-ICR MS llega a una resolución cercana a la masa del protón y por eso puede identificar fácilmente la mayoría de los compuestos de la MO. Además, el tipo de ionización utilizado (electrospray) evita la fragmentación múltiple de las macromoléculas, favoreciendo la interpretación de los datos.

Este instrumento es extremadamente caro y su difusión es limitada (existen alrededor de una decena de FT-ICR MS en Estados Unidos), pero las prestaciones analíticas pueden proporcionar una cantidad enorme de datos experimentales. Una vez que la mezcla entre muestra y solvente está ionizada, los iones generados pasan por una serie de filtros y polarizadores que conducen el flujo hasta el analizador ciclotrónico, que consta de un imán de gran tamaño y que, bajo vacío, atrapa los iones en su campo magnético interior y luego los hace resonar con la aplicación de una radiofrecuencia. Como para la RMN, los iones excitados tienden a volver al estado inicial emitiendo radiofrecuencias características para cada ion según su relación masa/carga y son registradas y representadas en espectros mediante la transformada de Fourier.

Aunque estas técnicas presentan problemáticas relacionadas con el tiempo necesario para llevar a cabo un análisis, el coste de instalación y mantenimiento de los aparatos y la preparación previa que necesitan las muestras, los datos obtenidos destacan por la cantidad, fiabilidad y resolución obtenidas, permitiendo confirmar hipótesis generadas a partir de la evaluación de otros parámetros y evaluar así dinámicas de degradación de los compuestos de la MO. Una vez estandarizados los métodos de análisis, estas técnicas pueden ser consideradas como el último recurso para evaluar la calidad del suelo, contando con que en un futuro sus costes sean más asequibles y su difusión más amplia.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

En el presente trabajo de Tesis se ha profundizado en el estudio de algunos aspectos poco conocidos del laboreo, concretamente, la posible influencia que puede tener esta práctica agrícola sobre la dinámica de la materia orgánica del suelo, en función de la intensidad con que se aplica.

El objetivo principal ha consistido en combinar nuevas técnicas analíticas con análisis tradicionales de tipo químico y bioquímico para profundizar en el conocimiento de la composición de la materia orgánica y clasificar los procesos oxidativos que se desarrollan en suelos agrícolas sometidos a distintos tipos de laboreo, proporcionando una visión completa de los beneficios que la agricultura de conservación puede originar.

Con este fin fueron seleccionadas dos fincas experimentales como área de estudio, una en condiciones de secano y la otra de regadío, y una finca comercial, todas ellas situadas en el suroeste de Andalucía, bajo condiciones climáticas de tipo Mediterráneo.

El estudio se realizó en función de los siguientes objetivos específicos:

- Preparación de distintas clases de muestras de suelo: suelo masivo procedente de distintas profundidades, tratado con HF para sucesivos análisis de RMN, fracciones de suelo, separadas por tamaño de agregados, y, finalmente, fracciones de materia orgánica particulada separadas por densidad y fracciones de ácidos húmicos.
- Evaluación de las pérdidas de carbono orgánico en el suelo masivo y en las distintas muestras analizadas, y de las fracciones más lábiles, como carbono activo e hidrosoluble. Cálculo de la razón de estratificación del carbono orgánico a partir de las muestras de suelo masivo.
- Evaluación de parámetros biológicos y bioquímicos en suelo masivo y en las distintas fracciones analizadas: carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana y

actividades enzimáticas deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, arilsulfatasa, proteasa y β -glucosidasa. Cálculo de las razones de estratificación de los parámetros bioquímicos y microbiológicos en muestras de suelo masivo.

- Evaluación de los efectos del herbicida glifosato sobre distintos parámetros relacionados con la calidad del suelo mediante determinación de la variabilidad temporal de los mismos.
- Puesta a punto de técnicas analíticas para analizar la materia orgánica por espectrometría de resonancia magnética nuclear y por espectrometría de masas, contando con el apoyo de otros centros de investigación en Europa y Estados Unidos.
- Selección de índices de calidad de suelos de fácil aplicación para su utilización en fincas comerciales.
- Indicar por último que, aunque sin formar parte de los objetivos fundamentales de la Tesis Doctoral, anualmente se realizó un seguimiento básico del desarrollo y rendimiento de los cultivos, con el fin de comprobar que el establecimiento de distintos tratamientos de laboreo de conservación no resultan perjudiciales.

III. Materiales y *Métodos*

III.1. ÁREAS DE ESTUDIO

Los experimentos que se presentan en este trabajo de tesis se llevaron a cabo en tres fincas: dos de ellas son fincas experimentales, la primera pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (finca “La Hampa”), la segunda pertenece a la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía (finca “Alameda del Obispo”) y la tercera es una finca comercial gestionada por la Sociedad Española de Agricultura de Conservación (finca “Las Navas”). Las características climáticas de las tres zonas son parecidas y de tipo Mediterráneo. Según los datos registrados la precipitación media anual es de unos 496 mm (1971-2012) en la finca “La Hampa”, de unos 595 mm (2000-2011) en la finca “Alameda del Obispo” y de unos 550 mm (2000-2010) en la finca “Las Navas”.

No obstante se han registrado años anormalmente secos con lluvias no superiores a 250 mm, y otros extraordinariamente húmedos con algo más de 1200 mm, lo que refleja la gran variabilidad de las precipitaciones en el suroeste de España.

El régimen termométrico la caracteriza como zona templada, con una media anual que ronda los 17 ° C en las tres áreas. Las temperaturas más bajas se registran en el mes de enero, con una media de mínimas de unos 4° C. El mes más cálido es agosto con unos 34° C , difiriendo la temperatura de verano con respecto a la de invierno en 14° C aproximadamente. Las características de las diferentes zonas se detallan a continuación.

III.1.1. FINCA “LA HAMPA”

➤ Localización geográfica

Esta finca está situada en el término municipal de Coria del Río (Sevilla), a 0,5 km de esta localidad, con coordenadas 37° 17’ N, 6° 3’ O y a 30 m sobre el nivel del mar (Fig. III.1). La gestión de la finca es responsabilidad del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) desde 1971.



Figura III.1. Imagen de satélite de la Finca “La Hampa”.

➤ Características edafológicas de la zona

La finca se encuentra en una zona topográficamente ondulada, perteneciente al mioceno del Aljarafe. El suelo de las parcelas se clasificó como Xerofluvent (Soil Survey Staff, 1999), con un $\text{pH}_{(\text{agua})}$ de 8,0, un contenido de carbonatos que ronda el 30% y una textura franco-areno-arcillosa, con un contenido de arena en la capa superficial (0-10 cm) de 50-55%, un 19-24% de limo y un 25-27% de arcilla (López-Garrido *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 1997).

➤ Rotación de cultivos

En las parcelas experimentales de La Hampa se estableció, en condiciones de secano, una rotación de cultivos trigo (*Triticum aestivum/durum*, L. en 2007-08, 2010-11) -guisante (*Pisum sativum*, L. en 2005-06, 2008-09 y 2011-12)-girasol (*Helianthus annuus*, L. en los años 2007, 2010 y 2013) (inicialmente trigo-girasol, incorporándose un cultivo de guisante forrajero en el año 2005 para actuar como “abono verde” y favorecer la fijación de nitrógeno atmosférico en el suelo).

La fertilización de las parcelas, según las prácticas tradicionales de la zona, se lleva a cabo sólo en las campañas del cereal. En los últimos años, se utilizó como abono de fondo un abono triple 15 (N-P-K) con una dosis de 150 kg ha^{-1} , y una cobertera de unos 100 kg ha^{-1} de urea. En las dos últimas campañas de trigo se suprimió la cobertera.

Normalmente, las parcelas bajo laboreo tradicional (LT) no necesitan la aplicación de herbicidas, dado que las malas hierbas son enterradas por el volteo de suelo producido por la vertedera. En las parcelas bajo laboreo de conservación (laboreo reducido, LR y no laboreo, NL), es necesario aplicar tratamientos fitosanitarios, en nuestro caso a base de trifluralina (2 L ha^{-1}) o glifosato al 18% (4 L ha^{-1}). En casos de excepcional crecimiento de malas hierbas, la aplicación de glifosato puede repetirse por segunda vez; en las parcelas bajo LT podría ser necesaria una desbrozadora mecánica.

➤ Establecimiento de los experimentos

En la finca “La Hampa” se dispone de tres experimentos diferentes, establecidos en un área de unos 5800 m^2 , en los que se comparan tres tipos de laboreo bajo condiciones de secano.

El primer experimento se estableció en el 1992, en una superficie de aproximadamente 2500 m^2 que se dividió en 6 subparcelas de aproximadamente 300 m^2 ($22 \times 14 \text{ m}$) para establecer dos tratamientos de laboreo (3 subparcelas por tratamiento con un diseño experimental de bloques al azar): LT, típico de la zona para agricultura de secano y LR. Este experimento se define como experimento de larga duración y en lo sucesivo los dos tratamientos serán denominados como LT_L y LR_L .

El segundo experimento se estableció en 2004, en un área de 1250 m^2 que se dividió en 6 subparcelas de 200 m^2 aproximadamente ($22 \times 9 \text{ m}$). Este experimento se define como ensayo de media duración y consta de dos tipos de laboreo, laboreo tradicional (LT_M) y no-laboreo (NL_M). Las subparcelas se distribuyeron según el mismo diseño experimental de bloques al azar con 3 subparcelas por tratamiento. Por último, en 2008, un área de unos 2000 m^2 se dividió en 9 subparcelas para comparar tres tratamientos: laboreo tradicional (LT_C), laboreo reducido (LR_C) y no-laboreo (NL_C), según un diseño experimental de bloques al azar y tres subparcelas por tratamiento. Este ensayo se define como ensayo de corta duración.

➤ Tipos de laboreo

La modalidad de laboreo tradicional en estos tres ensayos de corta, media y larga duración se caracteriza por la utilización de un arado de vertedera, hasta unos 25-30

cm de profundidad. Este tipo de arado provoca el volteo del suelo, siendo necesaria la implementación de otras labores posteriores para preparar una adecuada cama de siembra (en nuestro caso, uno o dos pases de grada, dependiendo de las características del año, a unos 15 cm de profundidad, y un último pase de desbrozadora justo antes de la siembra).

Hasta el año 2003, los residuos de cultivo de estas parcelas (LT) eran quemados. Una vez prohibida esta práctica, el manejo de los residuos del cultivo anterior puede variar según la naturaleza y la rentabilidad de los mismos, siendo normalmente vendida la paja de trigo y en casos esporádicos la del guisante, mientras que los tallos de girasol se retiran. Los restos que todavía pudieran quedar en el suelo son enterrados por el efecto de la vertedera.

El laboreo reducido, experimentos de larga y corta duración, se lleva a cabo prescindiendo del uso de la vertedera, dejando siempre una cubierta de residuos en la superficie del suelo, suficiente para cubrir como mínimo un 30% de la misma, de acuerdo con la definición de laboreo de conservación establecida por el CTIC (CTIC, 1996; Gajiri *et al.*, 2002). Para evaluar este porcentaje se contó cada 10 cm el número de veces que un residuo tocaba una cinta de 10 m, extendida varias veces en cada parcela (ángulo de 30° - 45° con las líneas de cultivo). Este número equivaldría, de forma aproximada, al porcentaje de superficie cubierta por residuos.

El número y la profundidad de las labores realizadas en este tratamiento se reducen notablemente, suele bastar con un pase de “chisel” (cincel) a unos 15-20 cm de profundidad y un pase posterior de grada de discos a poca profundidad, antes de la siembra.



Figura III.2. Parcelas experimentales de la finca “La Hampa”.

En las parcelas bajo NL, tanto en el experimento de corta como en el de media duración, un amplio porcentaje de la superficie del suelo queda cubierto con residuos, comprobado según la metodología propuesta por Plaster (1992). En este tratamiento no se lleva a cabo ninguna labor previa a la siembra y el suelo sólo se perturba por la reja de la máquina sembradora (unos 5 cm de anchura y profundidad) que incorpora directamente las semillas en el suelo.

III.1.2. FINCA “ALAMEDA DEL OBISPO”

➤ Localización geográfica

Esta finca experimental pertenece a la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía gestionada por el Instituto de Formación Agraria y Pesquera (IFAPA). En concreto, el área de ensayo utilizada en el experimento del apartado V.5. está siendo utilizada por los investigadores del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba (IAS-CSIC). La finca se sitúa en el término municipal de Córdoba, a 4 km del centro de esta ciudad, con coordenadas 38° N y 5°W O y a 110 m sobre el nivel del mar (Fig. III.3).

➤ Características edafológicas de la zona

El suelo de las parcelas es de tipo arcilloso y aluvial y se clasificó como Typic Xerofluent (Soil Survey Staff, 1999). En los primeros 15 cm, el contenido de arena es el 35,1%, con un 44,3% de limo y un 20,6% de arcilla. El $\text{pH}_{(\text{agua})}$ y la conductividad eléctrica son de 8,4 y 0,3 dS m^{-1} respectivamente.

➤ Rotación de cultivos

Desde el 2007, se dispone de parcelas experimentales donde se comparan dos tipos diferentes de laboreo bajo condiciones de riego. La rotación elegida fue algodón (*Gossypium hirsutum*, L.)- maíz (*Zea mays*, L.).

Según las prácticas locales, sólo el cultivo de maíz se fertiliza con 90 kg ha^{-1} de cada uno de los nutrientes N, P y K, esparciendo la mezcla a los pocos días de la siembra, realizando posteriormente (un mes de la siembra) una cobertera de 280 kg ha^{-1} de urea (46%). En estas parcelas se hace necesario el uso de herbicidas pre-siembra, pre- y post-emergencia, además de realizar una eliminación manual de

malas hierbas un par de veces al año. En caso de detectar la presencia de insectos mediante trampas detectoras, se aplicaron tratamientos para un manejo integrado de plagas que varió según la campaña y el año.



Figura III.3. Imagen de satélite de la Finca "Alameda del Obispo".

➤ Establecimiento del experimento

Aproximadamente 7800 m² de la finca "Alameda del Obispo" están dedicados a la comparación de dos tipos de laboreos en condiciones de riego.

En el año 2007, se prepararon las parcelas mediante dos pases de grada de discos (15 cm de profundidad), un pase de "chisel" (25 cm de profundidad) y un pase de "rotavator" (15 cm de profundidad). Días después se crearon lomos a una distancia de 85 cm uno de otro.

En los primeros meses de 2008, se delimitaron tres bloques de 18 x 144 m y en cada uno de ellos se establecieron dos tratamientos diferentes: i) lomos permanentes (LP) sin ninguna labor anual, y ii) lomos labrados y restablecidos cada año, según las practica tradicionales de laboreo (LT). De esta forma contrastaríamos de nuevo una modalidad de laboreo de conservación (LP) frente a otra de laboreo tradicional (LT).

Debido al interés que tiene evaluar los efectos que puede tener el tráfico de la maquinaria sobre la estructura y la calidad del suelo, especialmente bajo condiciones

de riego, por cada tratamiento se establecieron 5 surcos sujetos a tráfico (+T) y otros 5 que no fueron perturbados por el peso de la maquinaria (-T). La distancia entre dos surcos con tráfico fue de 1,70 m (Fig. III.4), debido al ancho del eje del tractor (2,08 m) y al ancho de los neumáticos del mismo (38 cm). En el caso del tratamiento LT, son necesarios de 5 a 9 pases de maquinaria a lo largo de la campaña y posteriormente se labra completamente la parcela entre una campaña y la siguiente. En LP, los surcos con tráfico sólo fueron afectados durante las primeras labores preparatorias (Boulal *et al.*, 2012).



Figura III.4. Parcelas experimentales de la finca “Alameda del Obispo”. Se aprecian los surcos “con tráfico (+T)” pisados por las ruedas del tractor y los otros “sin tráfico (-T)” que permanecen inalterados.

➤ Tipos de laboreo

El tratamiento convencional de este ensayo (LT) constituye la práctica más común de laboreo en condiciones de riego en este área geográfica. Los residuos del cultivo anterior se desbrozan mecánicamente y se incorporan posteriormente al suelo con las labores. El tipo y la profundidad de las mismas varían según el año, el cultivo y las condiciones del suelo, manteniendo constante la labranza de los lomos que tienen que ser reconstruidos cada año. En los años seleccionados para este estudio, fueron necesarios dos pases de grada de discos y uno posterior de “chisel” en 2008, mientras que en 2009 se efectuó un solo pase de “chisel” y otro de “rotavator”. En el año 2010 se realizó un pase de subsolador (60 cm de profundidad), uno de grada de disco y posteriormente un pase de “chisel” y uno de cultivador.

En el tratamiento LP, los residuos se desbrozan y se dejan en superficie, no se lleva a cabo ningún tipo de labor, y solo se reconstruyen los lomos en el caso de que hayan sido dañados durante la recolección.

III.1.3. FINCA “LAS NAVAS”

➤ Localización geográfica

Esta finca está situada en proximidad de la barriada rural de Gibalbín, termino municipal de Jerez de la Frontera (Cádiz) con coordenadas 36° 50' 29,92" N, 5° 55' 11" O y a 36 m sobre el nivel del mar (Fig. III.5). La gestión de la finca la lleva a cabo la Sociedad Española Agricultura de Conservación desde el 1999.

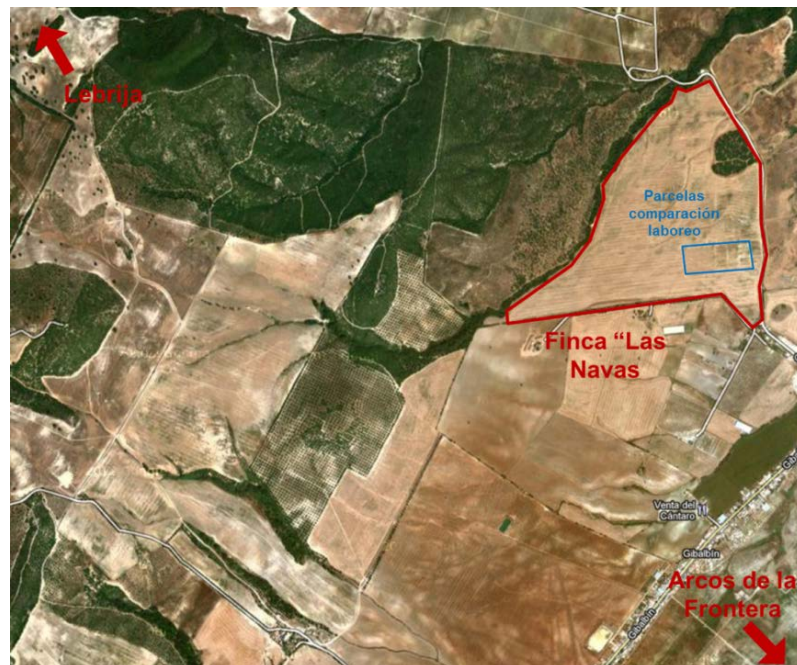


Figura III.5 Imagen de satélite de la Finca “Las Navas”.

➤ Características edafológicas de la zona

La finca presenta una pendiente media del 18% (apreciable en la Fig III.6), el suelo es de tipo franco-arcilloso con un contenido en carbonatos muy alto, especialmente en los estratos sub-superficiales (60-70%, Fig. III.6, Fig. III.7), clasificado como suelo Leptic Typic Xerorthent (Soil Survey Staff, 1999), con una textura en la capa superficial del suelo (0-10 cm) de tipo franco-arcillosa, un

contenido de arena del 32,3%, un 31,5% de limo y un 35,2% de arcilla y con un $\text{pH}_{(\text{agua})}$ próximo a 8.



Figura III.6. Imagen de las parcelas experimentales establecidas en la Finca “Las Navas”.



Figura III.7. Muestreo del suelo en la Finca “Las Navas”.

➤ Rotación de cultivos

La finca agrícola “Las Navas” está siendo cultivada en condiciones de secano y bajo no laboreo (siembra directa) desde el año 1999, excepto el año 2006 cuando fue necesario efectuar una labor muy superficial para solucionar un problema de malas hierbas.

La rotación de cultivos es típica de la zona, con una alternancia de trigo de invierno (*Triticum aestivum*, L. en 1999 y 2002) o trigo duro (*Triticum durum*, Desf. en 2001, 2004, 2006 y 2007) y girasol (*Heliantus annuus* L., en 2000, 2003 y 2005).

Desde el año 2008 se ha incorporado en la rotación la veza (*Vicia sativa*, L.); la introducción de una leguminosa (veza) resulta útil para fijar nitrógeno atmosférico (“abono verde”).

En todos los tratamientos, siguiendo las prácticas tradicionales locales, el suelo se fertiliza sólo en el año del cereal. Se utiliza un abono de fondo compuesto (18N - 46 P₂O₅ - 0 K₂O) a razón de unos 200 kg ha⁻¹ y una cobertera de 250 kg ha⁻¹ de urea (46%).

En nuestro experimento, el control de malas hierbas en las parcelas bajo laboreos de conservación (NL, no laboreo y LR, laboreo reducido) se realizó siguiendo la misma técnica que en el resto de la finca: aplicación de un herbicida (glifosato) justo después de la siembra, a una concentración de 2L ha⁻¹. En las parcelas de laboreo tradicional, LT, la utilización de la vertedera es suficiente para controlar las malas hierbas por lo que se ha suprimido el uso de herbicidas.

➤ Establecimiento de los experimentos

En el año 2008 se estableció la parcela experimental, dividida en nueve subparcelas de unos 300 m² cada una y pasillos de 1,5 m entre ellas (5 m entre bloques) distribuidas en un diseño de bloques al azar. Se aplicó laboreo reducido (LR) en tres subparcelas y laboreo de tipo tradicional (LT) en otras tres subparcelas, dejando las tres restantes bajo siembra directa (NL).

En las parcelas bajo laboreo reducido se dejan los residuos sobre la superficie del suelo a modo de cubierta y se realiza una labor de ‘cincel’ (‘chisel’, a unos 15-25 cm de profundidad), y se limita el número de operaciones posteriores a una sola labor de grada de discos (de unos 15 cm de profundidad). La cantidad de residuos cubre normalmente más del 60% de la superficie de las parcelas LR, comprobado siguiendo las indicaciones de Plaster (1992), lo que confirma que se trata de un verdadero laboreo de conservación (CTIC, 1996; Gajri *et al.*, 2002)

Básicamente, el laboreo tradicional consistió en aplicación de vertedera, hasta unos 30 cm de profundidad, con volteo de suelo para la preparación de la cama de siembra. Posteriormente, y dependiendo de las características del año y cultivo se realiza una labor de grada (unos 15 cm de profundidad) y/o ‘cincel’ (unos 15-20 cm de profundidad). Esta modalidad de labranza es típica de la zona para agricultura de secano.

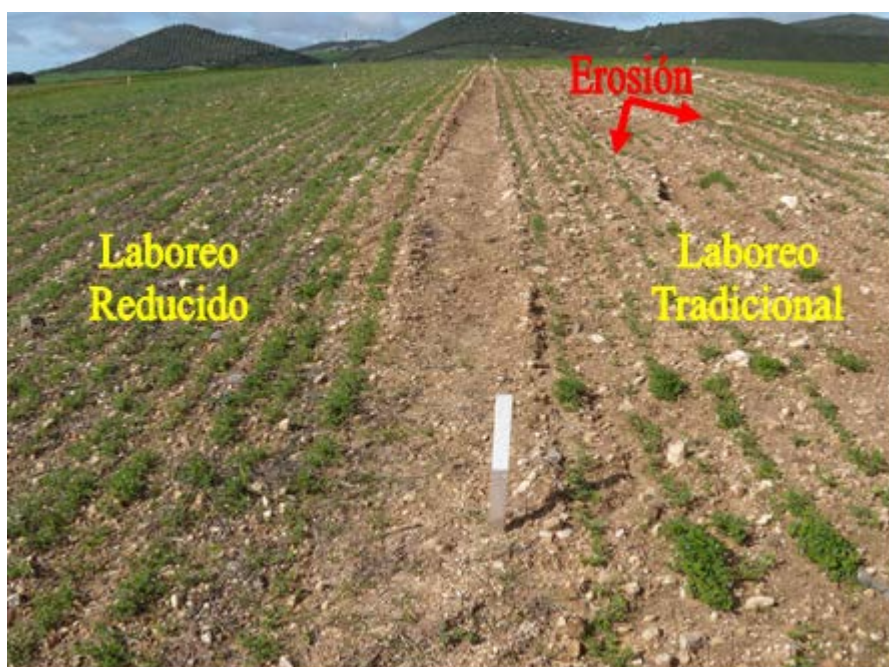


Figura III.8. Parcelas experimentales de la finca “Las Navas”.



Figura III.9. Daños provocados por la erosión en las parcelas experimentales bajo laboreo tradicional de la finca “Las Navas”.

Bajo no-laboreo se suprime cualquier tipo de labor, exceptuando la ‘reja’ de siembra (unos 5 cm de profundidad) realizada por la sembradora. Como en el laboreo reducido, los restos del cultivo anterior se dejan sobre la superficie del suelo a modo de cubierta.

Después de la primera campaña, se decidió prescindir del uso de la vertedera en las parcelas LT, debido a la aparición de amplias cárcavas (Figuras III.8 y III.9) en algunas zonas de las parcelas bajo laboreo tradicional. Desde el otoño 2009 se ha suprimido el LT en su totalidad, de forma que dos tercios de las parcelas se cultivan bajo LR y el tercio restante bajo NL

III.1.4. FINCAS COMERCIALES

Con el objetivo de valorar cómo la información científica de divulgación llega al agricultor y que sugerencias son mejor recibidas y aplicadas, los investigadores del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba (IAS-CSIC), en colaboración con el personal del IRNAS-CSIC, han evaluado algunos aspectos del laboreo (contenido de COT, actividad β -glu, densidad aparente y manejo de residuos en 20 fincas comerciales de Andalucía agrupadas en cinco zonas por cercanía geográfica, de las provincias de Sevilla (Écija), Huelva (La Palma del Condado) y Córdoba (La Montiel-Écija, La Rambla-Santaella y Santa Cruz). Para eliminar variables debidas a los diferentes cultivos, se seleccionaron sólo fincas con una rotación trigo-girasol. Cada zona comprendió dos fincas, una por cada cultivo, que se pueden reagrupar en el macro-grupo de “laboreo mínimo” (donde el agricultor afirma seguir en su totalidad o en parte, de las directivas establecidas para el laboreo de conservación). Otras dos fincas fueron caracterizadas como de “laboreo convencional”.

Parte de los resultados del trabajo desarrollado por Carmona *et al.* (en preparación), centrados en el COT y en la β -glu como indicadores de calidad del suelo, se presentarán en este trabajo de Tesis como información adicional.

III.2. MUESTREO Y ANÁLISIS DE SUELOS

III.2.1. TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las fechas de los muestreos efectuados en las distintas áreas de estudios se indican en las publicaciones científicas correspondientes (Capítulo V). Normalmente, los muestreos se llevaron a cabo antes de la siembra del cultivo y en

algunos casos después de la recolección del mismo, procurando no muestrear justo después de las labores.

En todos los casos, los muestreos de suelo se realizaron tomando muestras a profundidades de 0-5, 5-10 ò 10-25 cm según el ensayo.

Las muestras se guardaron en nevera hasta su llegada al laboratorio. Inmediatamente se midió la humedad mediante el método gravimétrico; el suelo húmedo que no se utilizó para la determinación de humedad fue tamizado (luz de malla de 2 mm de paso de luz) y se dividió en dos fracciones. Una de ellas se almacenó inmediatamente a 4 °C en bolsas de plástico hasta la realización de los análisis bioquímicos. La otra fracción se secó al aire para su análisis químico.

Para realizar el fraccionamiento por agregados se realizaron muestreos específicos de la capa superficial (0-10 cm). El fraccionamiento se llevó a cabo según el protocolo de Schutter y Dick (2002): las muestras envueltas en un papel poroso se secaron en cámara fría a una temperatura de 4° C hasta llegar a un contenido de humedad ideal (< 8%) para las operaciones de tamizado. Se utilizó una batería de tamices y una tamizadora CISA® (modelo Rp.09) para obtener 6 fracciones de agregados por tamaño: >5 mm de diámetro, 2-5 mm de diámetro, 1-2 mm de diámetro, 0,5-1 mm de diámetro, 0,25-0,5 mm de diámetro y <0,25 mm de diámetro.

III.2.2. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES QUÍMICAS

➤ Carbono Orgánico Total (COT)

Las determinaciones de carbono orgánico oxidable (también definido como carbono orgánico total) se realizaron según el método de Walkley y Black (1934), mediante oxidación de la materia orgánica presente en la muestra seca de suelo con dicromato potásico 1N en medio sulfúrico, valorándose el exceso de dicromato con sal de Mohr (solución 0,5 N de sulfato ferroso-ámónico) y utilizando un valorador automático Mettler Toledo G20 Compact Titrator equipado con un electrodo DMI 140-SC con anillo de platino.

➤ Carbono Activo (CA, o Permanganate Oxidizable Carbon, POXC)

El carbono activo se determinó según el método de Weil *et al.* (2003) mediante la oxidación de las muestras con una solución 0,02 M de permanganato potásico y 0,1M de cloruro cálcico a un pH de 7,2. El exceso de reactivo después de 2 minutos en agitación se midió en un espectrofotómetro (PERKIN ELMER, Lambda EZ210) a 550 nm, preparando una recta patrón a concentraciones conocidas de la solución oxidante.

➤ Carbono Hidrosoluble (CH)

Para extraer el carbono hidrosoluble se agitan las muestras secas en tubos de centrifuga durante 1 h ora, con una relación suelo/agua de 1:10. Después se centrifuga a 15.000 revoluciones (10 minutos) y se filtra a través de filtros Whatman 2. El C orgánico del extracto se midió en un analizador de Carbono TOC-VCSH Shimadzu.

III.2.3. DETERMINACIONES BIOLÓGICAS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Los valores de las actividades enzimáticas y del carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana, publicados en los trabajos del capítulo V, se expresan sobre suelo seco.

➤ Carbono de la Biomasa Microbiana (CBM)

El CBM fue determinado por el método de la fumigación-extracción con cloroformo, modificado por Gregorich *et al.* (1990)

Las muestras se fumigan con cloroformo (0,5 mL) durante 5 minutos; el solvente disuelve las membranas y las paredes celulares de los microorganismos liberando el contenido. Se extrae el carbono con una solución de sulfato potásico 0,5M, tras agitar durante 15 minutos, se filtra y se elimina el exceso de cloroformo haciendo pasar aire libre de CO₂ por el extracto. Los controles siguen el mismo procedimiento sin la fumigación con cloroformo.

La concentración de C en el extracto se mide en un analizador de Carbono TOC-VCSH Shimadzu, restándole al valor obtenido el de los controles no fumigados para obtener la concentración de CBM.

➤ Nitrógeno de la Biomasa Microbiana (NBM)

El NBM fue determinado según el mismo método utilizado para el CBM (Gregorich *et al.* 1990). La medida del contenido en N del extracto se efectuó utilizando el módulo de nitrógeno del analizador de Carbono TOC-VCSH Shimadzu, restando el valor de los controles a las muestras fumigadas.

➤ Actividad β -glucosidasa (β -glu)

La enzima β -Glucosidasa es una enzima extracelular que está relacionada con la degradación de los restos de cultivo, y es la encargada de catalizar las últimas reacciones de ruptura de los enlaces glucosídicos de los polímeros típicos del reino vegetal (celulosa, almidón etc.), liberando glucosa (Lehninger *et al.*, 2005).

La determinación de la actividad β -glucosidasa se realizó según Tabatabai (1982), incubando 1 g de suelo (peso húmedo), durante 1 h e n tampón glucopiranosido a pH 6 (PNG) (0,025 M), en un ba ño de agitación (Selecta Unitronic Or). Al término de la incubación, se añadieron 1 ml de CaCl_2 (0,5 M) y 4 ml de tampón TRIS (0,1 M pH = 12), y la suspensión se filtró. Los controles se prepararon añadiendo PNG después de la incubación. En el extracto filtrado, se determinó en un espectofotómetro (PERKIN ELMER, Lambda EZ210) (400 nm) la concentración del producto formado *p*-nitrofenol (PNF). La recta patrón se realizó preparando disoluciones de concentración conocida de PNF. El resultado se expresó en $\text{mg PNF kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

➤ Actividad Deshidrogenasa (DHA)

Las deshidrogenasas son enzimas que pueden catalizar la oxidación y reducción de compuestos orgánicos, en nuestro caso la oxidación de la materia orgánica del suelo. Gracias a l a localización intracelular del enzima, la medida de su actividad proporciona de manera muy sencilla una cuantificación del número y de la eficacia de los microorganismos del suelo (Nannipieri *et al.*, 1990; Skujins, 1976; Tabatabai, 1982; Trevors, 1984).

La actividad deshidrogenasa se determinó según el método de Trevors *et al.* (1984), basado en la incubación de la muestra de suelo (1 g en húmedo) durante 20 h en oscuridad en presencia de una disolución de cloruro 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenol 5 fenil tetrazolio (INT) al 0,4 % y agua (metodología establecida para suelos básicos). Al final de la incubación, el producto formado (iodonitrofenil formazano, INTF) se extrajo con metanol, agitando vigorosamente durante 1 min. Paralelamente se prepararon controles sin INT. La absorbancia del extracto se determinó en un espectofotómetro (PERKIN ELMER, Lambda EZ210) a 490 nm frente a disoluciones patrón preparadas con distintas concentraciones de INTF. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

➤ Actividad Proteasa (PR)

La actividad proteasa del suelo es responsable de la descomposición del nitrógeno contenido en las proteínas. Esta descomposición consta de unas sucesivas hidrólisis que originan N peptídico y finalmente N de aminoácidos. Las enzimas catalizadoras de estos procesos proceden en máxima parte de los microorganismos presentes en el suelo y se clasifican según el pH y el grupo nucleófilo empleado para la hidrólisis (García *et al.*, 1991).

Para evaluar esta actividad se utilizó el método de Ladd y Butler (1972) que se basa en la determinación colorimétrica (reacción de Folin) de los péptidos solubles en ácido tricloroacético después de incubar el suelo con una disolución de caseína. Tras pesar 1g de suelo húmedo, se añaden 5 mL del tampón TRIS-HCl (0,05 M pH = 8,1) y 5 mL de la disolución de caseína al 1% en tampón TRIS y se incuba durante 2h a 52°C. Al término de la incubación, se añade ácido tricloroacético al 75%, se agita 10 minutos, se centrifuga (10000 rpm) durante otros 10 minutos y se filtra (Whatman 2). Se pipetea 5 mL de sobrenadante y se le añaden otros 7,5 mL de un reactivo alcalino (disolución de NaOH, NaCO₃, CuSO₄ y C₄H₄KNaO₆), dejando reaccionar 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añade a la disolución el reactivo de Folin al 33% (5 mL) y se agita durante 10 min. Después de filtrar (Whatman 2) se mide la absorbancia a 700 nm. Se realiza una recta de calibrado con disoluciones estándar de tirosina y se prepara un control para cada muestra, donde la caseína se añade justo antes de la extracción del tricloroacético. Los valores se expresan en mg de tirosina $\text{kg}^{-1} \text{ 2h}^{-1}$.

➤ Actividad fosfatasa alcalina (FA)

Existen varias clases de enzimas comúnmente denominados “fosfatasas”, entre las que se encuentra el grupo de las monoesterofosfato hidrolasas que actúan sobre enlaces de tipo éster, y al que pertenecen las fosfatasas inespecíficas denominadas “ácida” y “alcalina” según el pH del suelo en el que se encuentran. Dado que esta actividad se midió en muestras de suelo básico, se describirá el método de Tabatabai y Bremner (1969) utilizado para evaluar la fosfatasa alcalina. Análogamente a lo descrito para la β -glucosidasa, este método mide espectrofotométricamente la cantidad de *p*-nitrofenol (PNF) liberado a partir del reactivo *p*-nitrofenilfosfato (PNP). Para ello, se pesa 1g de suelo húmedo y se añaden 4 mL de tampón universal modificado (MUB) de pH 11 y 1mL de la disolución de PNP (0,025M) y se incuba durante 1h a 37°C. Después de la incubación, se enfrían las muestras para detener la reacción y se añaden 1mL de CaCl_2 (0,5M) y 4mL de NaOH (0,5M), se agita, se filtra (Whatman 2) y finalmente se mide la absorbancia a 400 nm. Se realiza una recta de calibrado con unas disoluciones estándar de PNF y se prepara un control para cada muestra en el que el PNP ha sido añadido al suelo poco antes de las disoluciones extractantes.

➤ Actividad arilsulfatasa (AS)

Las arilsulfatasas son una de las clases de enzimas más abundantes en el suelo y catalizan la hidrólisis de ésteres aromáticos y no aromáticos de los sulfatos orgánicos, aumentando la concentración en el suelo del anión SO_4^{2-} , que puede ser entonces transportado al interior de las células. El método de determinación de esta actividad propuesto por Tabatabai y Bremner (1970) es análogo a los métodos propuestos para la APA y la β -glu y mide espectrofotométricamente el PNF producido por la hidrólisis ácida del sustrato *p*-nitrofenilsulfato (PNS). Se pesa 1g de suelo húmedo, se le añaden 4 mL de tampón acetato (0,5M) a pH 5,8 y 1 mL de PNS y se incuba 1 h a 37°C. Después de enfriar las muestras, se añade 1 mL de CaCl_2 0,5 M y 4 mL de NaOH 0,5 M, se centrifuga 10 min a 5000 rpm, se filtra y finalmente se mide la absorbancia a 400 nm. Como se ha descrito para los otros métodos, es necesario establecer una recta de calibrado con unas disoluciones estándar de PNF y preparar un control para cada muestra, donde el PNS se añade poco antes de las disoluciones extractantes.

III.2.4. ESPECTROMETRÍA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Las muestras de suelo masivo y de fracciones por tamaño de agregados se analizaron mediante técnicas de espectrometría de RMN. Además se decidió extraer fracciones de ácidos húmicos (AH) y materia orgánica particulada (MOP) del suelo superficial de la finca “La Hampa” para su caracterización mediante RMN y cuantificación de estas fracciones.

La polarización cruzada es la secuencia de pulsos más utilizada para medidas de espectrometría de resonancia magnética nuclear de ^{13}C de estado sólido.

Para efectuar un análisis de RMN de la MO del suelo, es necesario tener un contenido adecuado de carbono y reducir a un mínimo la presencia de compuestos paramagnéticos que pueden afectar la resolución del espectro. Previamente a las medidas de RMN es necesario secar completamente la muestra por liofilización y homogeneizarla mediante una molienda en un mortero de ágata. Un contenido de humedad elevado o una distribución espacial irregular en el interior del rotor pueden ocasionar una baja resolución de los espectros obtenidos.

➤ *Instrumentos*

Los resultados de RMN presentados en el apartado V.2. se obtuvieron en los laboratorios del Instituto de Bio- y Geociencias IBG3-Agrosfera en el Forschungszentrum de Jülich (Alemania). Estos laboratorios disponen, entre otros equipos, de un instrumento de RMN de tipo Varian INOVA™ NMR (Fig.III.9), que opera en un campo magnético de 7,05 T (300 MHz por el ^1H) y una frecuencia de resonancias para el ^{13}C de 75,4 MHz. La sonda utilizada es de tipo “wide bore broadband two-channel Apex”, que requiere unos rotores de 6 mm de zirconio aptos para el elevado número de revoluciones necesario en la rotación al ángulo mágico. Para una mejor resolución de los espectros, en este aparato se suele utilizar una tapadera y un separador de nitruro de boro hechos a medida, para restringir el espacio en el interior del rotor y para lograr que la muestra quede en el interior de la zona más homogénea del campo magnético creado por las bobinas superconductoras (Berns y Conte, 2011). El movimiento giratorio producido por una corriente de aire comprimido se transmite al rotor por medio de una punta giratoria de material

Vespel[®], una mezcla de policlorotrifluoretileno (PCTFE o Kel-F[®]) y grafito (Fig. III.11).

Los resultados de RMN presentados en el apartado V.5. se obtuvieron en el laboratorio “College of Sciences Major Instrumentation Cluster (COSMIC)” de la “Old Dominion University” en Norfolk, (Virginia, Estados Unidos). Se utilizó un espectrómetro de tipo “Bruker AVANCE II 400TM” (Fig. III.12) que opera a una frecuencia para el ^{13}C de 100,62 MHz y para el ^1H de 400,13 MHz. La sonda utilizada “CP-MAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning) 4mm multinuclear (^1H , ^{13}C , ^{15}N) probe” requiere en este caso unos rotores de zirconio de 4 mm de tipo “Bruker triple resonance” (Fig. III.13) y una punta giratoria de policlorotrifluoretileno (PCTFE o Kel-F[®]).



Figura III.10. Instrumento de espectrometría de resonancia magnética Varian INOVATM

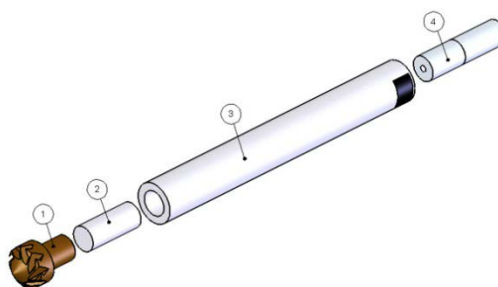


Figura III.11 Esquema de la composición de un rotor de CPMAS RMN de Varian (Agilent)[®] (1) Punta giratoria Vespel[®]; (2) separador y (4) tapadera de nitruro de boro; (3) Rotor de zirconio;

Imagen tomada desde <http://www.spinsights.net/tag/solid-state-nmr/>

Las secuencias de pulsos utilizadas en ambos ensayos fueron las típicas secuencias de polarización cruzada. El tiempo de contacto entre ^1H y ^{13}C establecido fue de 1.5 s, el tiempo de adquisición fue de 20 ms y el tiempo de espera entre dos secuencias de pulsos fue de 1 o 2 s, dependiendo del tipo de muestra. Dichos tiempos se establecieron mediante pruebas empíricas para obtener una correcta transferencia de la polarización heteronuclear, para adquirir la máxima cantidad de señal y la mínima de ruido y para permitir la relajación completa del sistema antes de empezar una nueva secuencia



Figura III.12. Instrumento de espectrometría de resonancia magnética Bruker AVANCE II 400TM



Figura III.13 Imagen de un rotor Bruker[®] de zirconio utilizado por el CPMAS RMN y 3 puntas giratorias de policlorotrifluoretileno (PCTFE o Kel-F[®]). Imagen tomada desde <https://store.bruker-biospin.com/shop/IT/product/H14355/>

Los parámetros descritos se mantuvieron a lo largo de todos los ensayos para asegurar reproducibilidad y mejorar la comparación de los resultados globales.

El número de secuencias adquiridas varió para cada muestra, debido a la diferente composición de algunas de ellas; para conseguir una resolución adecuada fueron necesarias unas 30000 secuencias para muestras de suelo masivo y 3000 secuencias para las muestras de materia orgánica particulada y ácidos húmicos.

➤ Suelo masivo

En el caso de las muestras de suelo masivo se procedió a analizar muestras conjuntas sin ninguna extracción previa. Debido al escaso contenido de C orgánico y al elevado contenido de minerales paramagnéticos es necesario un proceso de desmineralización de las muestras antes de analizarlas por RMN para obtener espectros de buena calidad. Las muestras de suelo analizadas fueron tomadas superficialmente (0-5 cm en el caso del apartado V.5; 0-10 cm en el caso del apartado V.2 para la separación en fracciones por tamaño de agregados).

Antes de realizar la desmineralización con HF 10% es necesario eliminar la mayor parte del carbonato de calcio presente en las muestras, dado que se pueden formar fluoruros de calcio insolubles que podrían afectar a los pasos siguientes. Para eso se añade HCl 1N a las muestras, con la formación de CO₂, y posteriormente se centrifuga y se recupera el precipitado. Ese procedimiento se repite varias veces según el contenido en carbonatos de los suelos, hasta que la adición de HCl deja de producir burbujas.

Para proceder a la desmineralización, es necesario seguir escrupulosamente todas las indicaciones de seguridad necesarias para manejar el ácido fluorhídrico, debido a su extrema peligrosidad. La disolución de HF 10% se añade a las muestras y se agita vigorosamente, centrifugando y desechando con cuidado el sobrenadante. El procedimiento tiene que ser repetido por lo menos 4 veces, dependiendo del tipo de suelo. Una vez terminado, es necesario lavar el precipitado varias veces, hasta llegar a pH=5, procediendo luego a la liofilización de la muestra antes de las medidas de RMN.

➤ Sustancias húmicas

A partir de una muestra conjunta del suelo superficial (0-5 cm) se procede a la extracción de los ácidos húmicos y fúlvicos (AF). Para ello, se utiliza una disolución extractante de NaOH y Na₄P₂O₇ y el extracto obtenido, que contiene las fracciones

fúlvicas y húmicas, se acidifica con HCl hasta pH=1 para separar los AH insolubles, en disoluciones muy ácidas, de los AF, que poseen una elevada solubilidad. Posteriormente se purifican las muestras obtenidas por diálisis, que permite eliminar la mayor cantidad de sales presentes derivadas del procedimiento de extracción. La mayor parte de los compuestos paramagnéticos se encuentran en la fracción fúlvica, mientras que la fracción húmica puede ser analizada mediante RMN después de la liofilización.

➤ Materia orgánica particulada

Análogamente a cuanto se ha descrito para las SH, la separación de las fracciones de materia orgánica particulada (MOP) se llevó a cabo en muestras conjuntas de suelo superficial (0-5 cm). Dicha separación se efectuó utilizando una disolución de polywolframato de sodio ($\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}$) a una densidad de $1,8 \text{ g cm}^{-3}$. En esta disolución, la parte más ligera de la MOP, definida como libre (MOP-L), flota y se puede retirar con una bomba de aspiración, mientras que la MOP asociada a las partículas de arcilla, definida como ocluida (MOP-O) se extrae mediante ultrasonidos y posteriormente se retira siguiendo el mismo método utilizado para la MOP-L. La fracción mineral que queda después de las extracciones, junto con las fracciones de MOP-L y MOP-O, tienen que ser purificadas, eliminando los restos de polywolframato mediante lavados y filtración. Una vez liofilizadas, ambas fracciones de MOP-L y MOP-O pueden ser analizadas por RMN.

➤ Análisis de los espectros

Los espectros obtenidos se evaluaron mediante el software MestReNova versión 7 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España), corrigiendo oportunamente la fase, aplicando una corrección de línea de base de puntos múltiples y una apodización entre 50 y 80 Hz según las características de cada espectro. La metodología propuesta utiliza el tetrametilsilano como referencia con desplazamiento químico (“chemical shift”) igual a 0 ppm. Se establecieron 5 regiones espectrales diferentes, asignando a cada una de ellas los compuestos correspondientes (presentan resonancia dentro de cada región) (Tabla III.1).

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica y a la dificultad de realizar replicados, una correcta evaluación semicuantitativa por integración de las regiones

espectrales debe tener en cuenta los límites de significación indicados por Baldock y Smernik (2002) y Diekov *et al.* (2005).

Tabla III.1. Asignación típica de los picos de RMN de ^{13}C en estado sólido a grupos funcionales presentes en muestras geoquímicas. (Referencia tetrametilsilano=0 ppm).

Desplazamiento químico (ppm)	Asignación
220-160	Carboxilo; Carbonilo; Carbono amídico
160-110	Grupos aril-COR o CNR; carbono Arílico (C-H); C ₂ , C ₆ de guayacilo en lignina; carbono olefínico Carbono anomérico de carbohidratos; C ₆ de carbohidratos; estructuras derivadas de
110-60	carbohidratos de hexosas; C ₂ , C ₆ de unidades siringilo de lignina; C _α de algunos aminoácidos; alcoholes de elevado peso molecular.
60-45	Grupo metoxilo; C _α de la mayoría de los aminoácidos , N-alquil C
45-0	Grupos metilénicos en anillos y cadenas alifáticos; grupos metílicos terminales.

En el primer trabajo Baldock y Smernik (2002) estiman que un 2% de diferencia entre las mismas regiones espectrales de dos tratamientos distintos es suficiente para considerar significativa esa diferencia. Sin embargo, Diekov *et al.* (2005) estimaron un nivel de significación distinto por cada región, que corresponde al 8,3% para la región del C carbonílico, al 5,0% para la región correspondiente al C aromático, al 2,2% para la región del C O-alquilico y al 4,9% en el caso del C alquilico. Considerando que Knicker *et al.* (2012) registraron diferencias que oscilaban entre 1 y 25% a lo largo de una gran finca agrícola brasileña, es de fundamental importancia elegir un diseño experimental adecuado y áreas bastante homogéneas para realizar una muestra conjunta.

III.2.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RESONANCIA IÓNICA EN CICLOTRÓN CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-ICR MS).

Las muestras de extractos húmicos y fúlvicos correspondientes al experimento de larga duración de la finca experimental “La Hampa” se analizaron mediante FT-ICR MS con un aparato híbrido Bruker Apex-Qe de altas prestaciones y un campo magnético activamente aislado de 12 T (Fig. III.14) perteneciente al laboratorio “College of Sciences Major Instrumentation Cluster (COSMIC)” de la “Old Dominion University” en Norfolk, (Virginia, Estados Unidos).

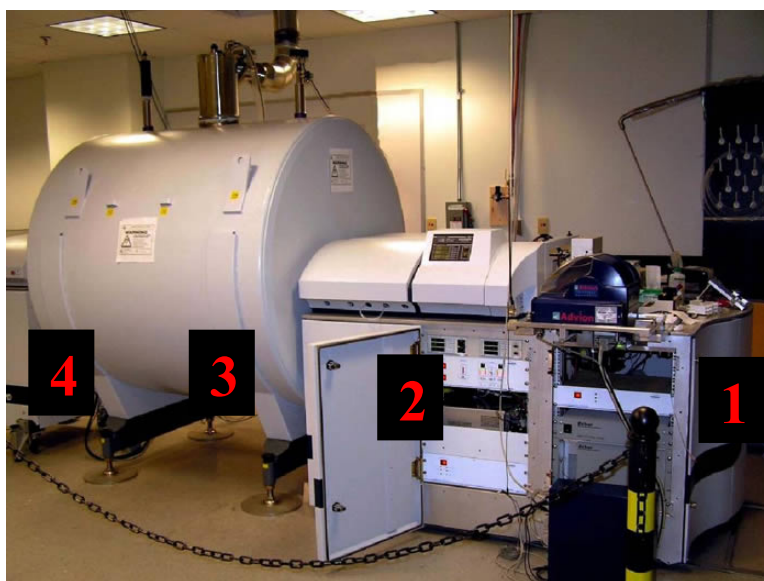


Figura III.14 Imagen del instrumento FT-ICR MS del laboratorio “COSMIC” en Norfolk (VA, EEUU). Se puede apreciar (1) la fuente de ionización por electrospray; (2) la línea de transferencia iónica; (3) el escudo aislante exterior del imán del analizador ciclotrónico; (4) la unidad electrónica donde se almacenan los datos obtenidos.

Las muestras se disolvieron en una mezcla de agua y metanol a pH 8 y se inyectaron con un automuestreador a la fuente de ionización por electrospray. Sucesivamente, los iones negativos generados pasan por una línea de transferencia iónica y son agrupados y transferidos mediante filtros y polarizadores hacia una región de alto vacío antes de entrar a la celda de analizador, constituida por el imán que genera el campo magnético. Una vez atrapados los iones en el analizador ciclotrónico, sus órbitas circulares, dependientes de la relación masa/carga, se perturban por secuencias de impulsos de radiofrecuencias, aumentando el radio de las órbitas. Esta alteración y la sucesiva relajación de los iones, que emiten

radiofrecuencias para volver al estado inicial, se miden mediante un analizador y se representan mediante la transformada de Fourier en forma de espectros.

La elevada resolución del instrumento (10^6) es la más alta disponible por el momento y además presenta la posibilidad de analizar una gran cantidad de iones al mismo tiempo y de repetir el ciclo de excitación/relajación varias veces durante la adquisición. Por estas razones el FT-ICR MS es una de las técnicas con más potencialidad para el análisis de muestras complejas de MO.

III.3. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico IBM-SPSS 19.0 para Windows (©SPSS Inc., an IBM company, 1989-2010, Chicago, Illinois); los resultados se expresaron como valores medios de los replicados obtenidos para cada muestra acompañados por las correspondientes desviaciones típicas (standard) (DS) o los errores típicos (standard) (ES).

Previamente, los datos se sometieron al test de Shapiro-Wilk para conocer si las variables de estudio seguían una distribución normal. Las variables que no presentaron esta distribución (test de Kolmogorov-Smirnov) fueron transformadas logarítmicamente antes de su tratamiento estadístico.

En casos de comparación de 2 tratamientos, las medias se analizaron mediante el test de la T-Student, adaptándose niveles de significación $p < 0,05$.

En casos de comparación de 3 o más tratamientos, se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA de un factor, realizándose la comparación múltiple de medias post-hoc mediante el test de Tukey en el caso de homogeneidad de las varianzas, o mediante el test de Games-Howell en caso contrario.

En algunos casos se efectuó un análisis factorial de los resultados, concretamente un análisis de componentes principales. Este análisis permite interpretar las variables e identificar los rasgos comunes que aparecen entre las respuestas de las variables sobre la función objetivo. Se obtienen unas variables ficticias que permiten relacionar y resumir una variable original o un conjunto de ellas con la función objetivo correspondiente.

Para identificar si los cambios en las variables independientes tienen efectos significativos en las variables dependientes que no pueden ser agrupadas fácilmente se utilizó un análisis multivariante de la varianza o MANOVA. La técnica también intenta identificar las interacciones entre las variables independientes y su grado de asociación con las dependientes ($p < 0,001$, $p < 0,01$ o $p < 0,05$).

Las matrices de correlación entre los diferentes parámetros se basaron en los coeficientes de Pearson con un nivel de significación de $p < 0,01$ o $p < 0,05$ según el caso.

IV. Resumen global
de los resultados

IV.1. EFECTOS DE UNA LABOR INTENSIVA SOBRE UN SUELO EROSIONABLE PREVIAMENTE CULTIVADO BAJO NO-LABOREO.

Los resultados más relevantes de los experimentos llevados a cabo en la finca “Las Navas” presentados en los apartados V.1 y V.2 han permitido afirmar con fundamentos científicos que las labores de vertedera pueden producir a corto plazo un empeoramiento evidente de la calidad de suelos erosionables y perjudicar la estabilidad de la capa superficial del mismo.

La primera publicación científica presentada *“Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in sw, Spain: effect on soil quality.”* destaca de manera clara cómo el pase de la vertedera ha favorecido la aparición de amplias cárcavas de erosión después de un solo año de implementación de este tipo de laboreo (Figs. III.8, III.9 y IV.1).



Figura IV.1. Daños provocados por la erosión en las parcelas experimentales bajo laboreo tradicional de la finca “Las Navas”.

El seguimiento de los parámetros químicos y bioquímicos realizado a lo largo de un año, relativo a tres muestreos diferentes, evidenció una disminución del 23% del contenido de COT en las muestras superficiales de las parcelas bajo LT, comparado con las parcelas en las que se mantuvo el tratamiento de NL (Tabla 1, apartado V.1). Análogamente, se observaron disminuciones de la concentración de

actividades enzimáticas (un 37% menos de DHA y un 51% menos de β -glu, figuras 2 y 3 apartado V.1) así como de los contenidos de POxC (-12%), CH (-27%), CBM y NBM (-44% y -37% respectivamente).

Por el contrario, la implementación de un laboreo reducido ('chisel') no ocasionó un deterioro significativo de la calidad del suelo, manteniendo niveles similares a los medidos en las muestras bajo NL para todos los parámetros analizados (apartado V.1, Tabla 1, Figuras 2 y 3).

La tabla IV.1 muestra una estimación de la cantidad de carbono presente en los primeros 10 cm de profundidad. Bajo LT se observó una pérdida de 5 toneladas de carbono superficial por hectárea y no se observó una redistribución de COT a profundidades menores (hasta 25 cm) por efecto de la inversión del suelo producida por la vertedera.

Tabla IV.1. Carbono orgánico acumulado por tratamiento en los primeros 10 cm de suelo de la finca "Las Navas" en octubre 2010.

<i>Tratamiento</i>	<i>Densidad aparente (g cm⁻³)</i>	<i>COT (g kg⁻¹)</i>	<i>Carbono orgánico acumulado (Mg ha⁻¹)</i>
<i>NL</i>	1,37	17,2	23,6
<i>LR</i>	1,35	17,1	23,1
<i>LT</i>	1,27	14,6	18,5

Para profundizar en el conocimiento de la dinámica de la MO del suelo de esa finca, se decidió llevar a cabo un análisis de los agregados separados por tamaño, resultados presentados en el artículo "Moldboard plowing effects on soil aggregation and soil organic matter quality assessed by ¹³C CPMAS NMR and biochemical analyses". Un vez más, el LT confirmó su efecto negativo sobre la calidad del suelo superficial, reduciendo el contenido de macroagregados (apartado V.2, Figura 1) y el contenido de COT, POxC y MBC (Apartado V.2, Figura 2 y 3) en comparación con las parcelas de NL. Como se observó en los análisis sobre suelo masivo, no se apreció un empeoramiento significativo de calidad de suelo en las muestras de las parcelas bajo LR.

Los análisis de NMR confirmaron que la MO de los tres tratamientos tiene una composición parecida, a excepción por un pico atribuible a residuos no degradados

de lignina que se encuentran en los agregados de mayor tamaño de las muestras de NL, y que no se detecta en las muestras correspondientes a los restantes tratamientos (apartado V.2, Figura 4).

La integración de las regiones espectrales permite identificar la intensidad relativa correspondiente a cada clase de compuestos orgánicos. La evaluación del conjunto de datos permitió afirmar que la finca posee un tipo de MO bastante degradada y humificada, típica de las fincas agrícolas (apartado V.2, Figura 5). Las diferencias más relevantes entre tratamientos se observaron en las regiones alquímica y *O*-alquímica, que definen de manera inmediata el estado de degradación de la MO. Las parcelas LT mostraron un contenido porcentual más alto de alquílicos y más bajo de *O*-alquílicos, comparado con el de las parcelas bajo LR y NL. Esto se refleja en una razón alquílicos/*O*-alquílicos hasta un 50% más alta (apartado V.2, Figura 6), que es indicativo de una MO más degradada.

IV.2 RELACIÓN TEMPORAL ENTRE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y DEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN UN SUELO BAJO DISTINTOS SISTEMAS DE LABOREO: ESTUDIO DE UNA CRONOSECUENCIA.

El fraccionamiento por tamaño de agregados llevado a cabo en la finca “La Hampa” en los dos experimentos de media y larga duración generó resultados ligeramente diferentes a los obtenidos en la finca “Las Navas”.

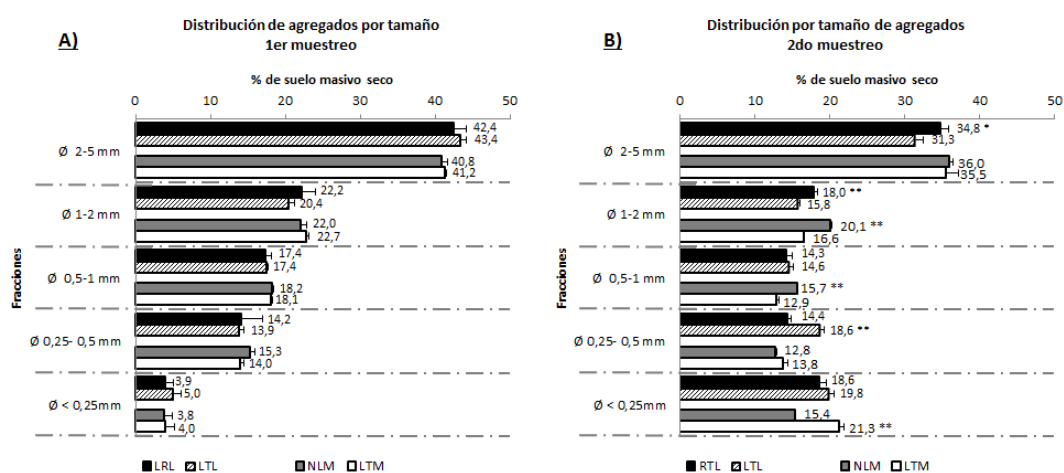


Figura IV.2. Distribución de agregados después del procedimiento de fraccionamiento en seco del suelo ($\varnothing < 5\text{mm}$) de la finca “La Hampa” en mayo (A) y septiembre (B) de 2010. *LR_L*: laboreo reducido, experimento de larga duración; *LT_L*: laboreo tradicional, experimento de larga duración; *NLM*: no-laboreo, experimento de media duración; *LT_M*: laboreo tradicional, experimento de media duración.

De los dos muestreos, sólo el segundo, efectuado en septiembre y después de un largo periodo seco, mostró diferencias significativas en la distribución de agregados, mientras que en el muestreo de mayo no se observaron diferencias significativas (Figura IV.2). Concretamente, en el segundo muestreo, en el tratamiento LR_L (laboreo reducido de larga duración) se obtuvo un número mayor de macro-agregados (\varnothing 2-5 mm) que bajo LT_L (laboreo tradicional de larga duración); en este último se obtuvo el mayor número de agregados de tamaño 0,25-0,5 mm. En el tratamiento de media duración, el tratamiento NL_M no favoreció la aparición de macro-agregados (2-5 mm) aunque ocasionó una mayor cantidad de agregados de tamaño 1-2 mm y 0.5-1 mm y menor cantidad de micro-agregados ($< 0,25$ mm).

Los parámetros químicos y bioquímicos analizados confirmaron que los tratamientos de conservación ocasionan mejoras en la calidad del suelo, aunque se notó una cierta variabilidad a lo largo del tiempo, probablemente a causa de las diferencias climáticas y a las diferentes etapas de la campaña agrícolas en las que se efectuaron los dos muestreos (Figura IV.3).

Cabe destacar los aumentos significativos de los contenidos de COT de la 1ª y 3ª fracción del primer muestreo (muestras de LR_L y NL_M) y de la 2ª y 3ª fracción (muestras de NL_M) y 3ª y 4ª fracción (RT_L) del segundo muestreo, en relación con los valores correspondientes de las muestras bajo LT. Análogamente, el contenido de CH del primer muestreo fue mayor en todas las fracciones del tratamiento LR_L que en las de LT_L, exceptuando la última fracción. También resultó mayor en las tres primeras de LT_M en relación con los valores obtenidos bajo NL_M. En el segundo muestreo, se observaron diferencias significativas, en relación con el tratamiento LT, en el caso de la 4ª fracción de LR_L y en todas las fracciones de NL_M exceptuando la primera fracción.

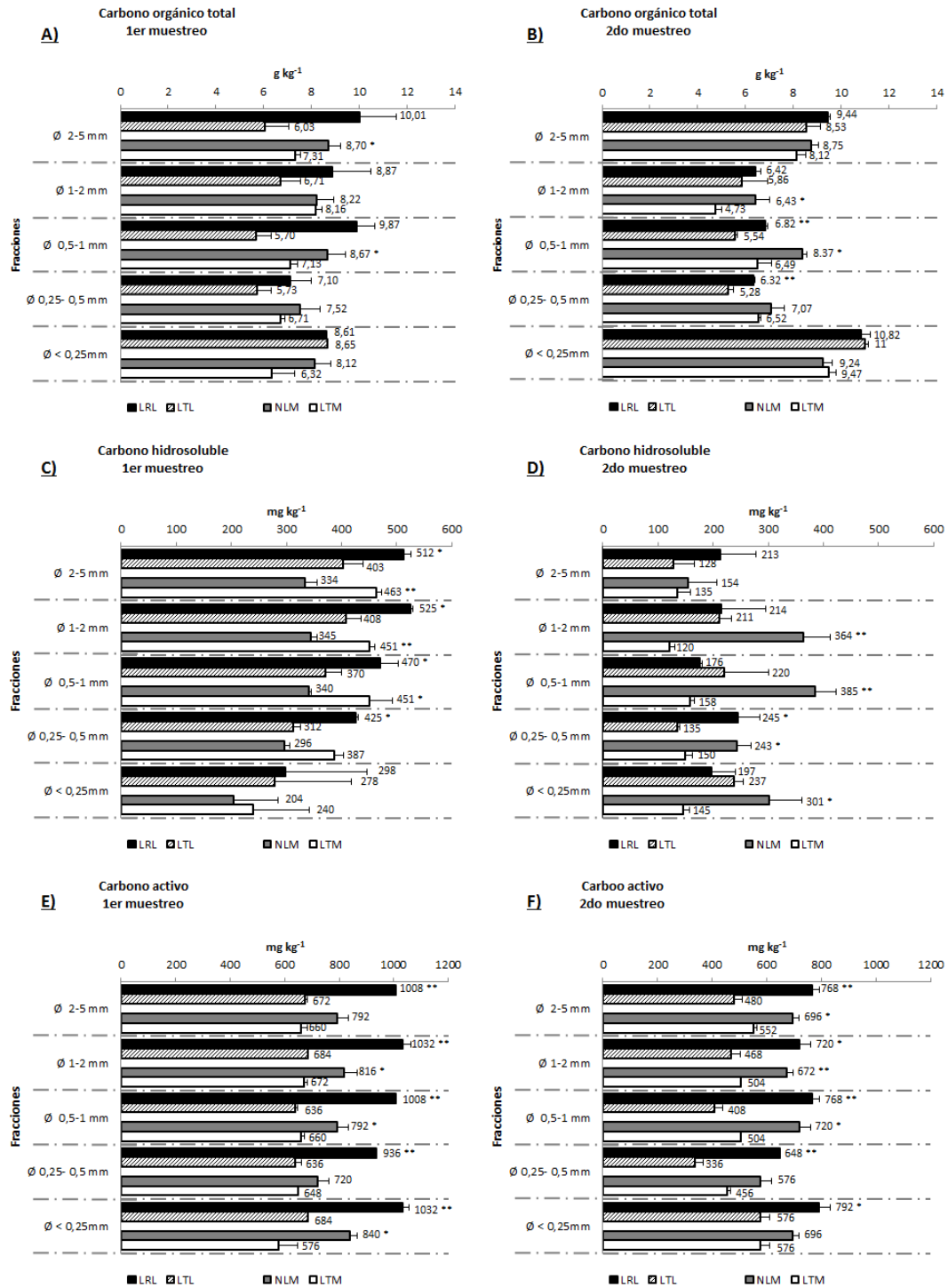


Figura IV.3. Valores de los parámetros químicos obtenidos después del procedimiento fraccionamiento en seco del suelo ($\varnothing < 5\text{mm}$) de la finca “La Hampa” en mayo (A, C y E) y septiembre (B, D y F) de 2010. LRL: laboreo reducido, experimento de larga duración; LTL: laboreo tradicional, experimento de larga duración; NLM: no-laboreo, experimento de media duración; LTM: laboreo tradicional, experimento de media duración. Las diferencias significativas se indican con asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

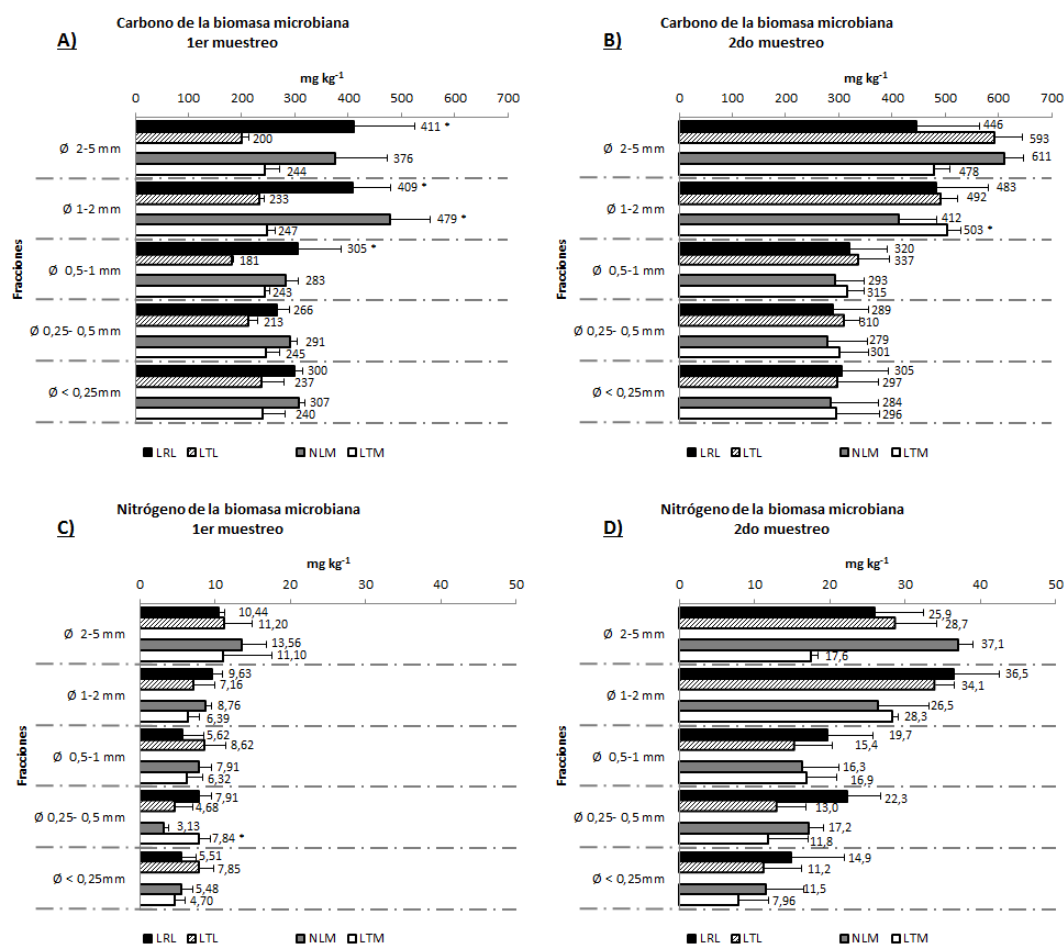


Figura IV.4. Parámetros bioquímicos obtenidos después del procedimiento fraccionamiento en seco del suelo ($\phi < 5\text{ mm}$) de la finca “La Hampa” en mayo (A y C) y septiembre (B y D) de 2010. LR_L: laboreo reducido, experimento de larga duración; LT_L: laboreo tradicional, experimento de larga duración; NL_M: no-laboreo, experimento de media duración; LT_M: laboreo tradicional, experimento de media duración. Las diferencias significativas se indican con asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

El PO_xC fue el parámetro que experimentó mayores variaciones, con aumentos significativos para la mayoría de las fracciones de los labores de conservación, en comparación con los tratamientos tradicionales.

En los análisis bioquímicos realizados (Figura IV.4), se detectaron valores de CMB significativamente más altos en las fracciones de mayor tamaño de LR_L y NL_M que en las muestras correspondiente de LT, en el primer muestreo, mientras que en el segundo muestreo, aunque los valores observados fueron generalmente más altos que en el primero, los tratamientos de laboreo tradicional mostraron cierta tendencia a valores algo más altos que los correspondiente tratamientos de conservación, aunque solo se observaron diferencias significativas en la 2ª fracción del experimento a medio plazo. El NBM no mostró diferencias significativas y se

detectó una elevada dispersión de los datos y un aumento de los valores en el 2º muestreo.

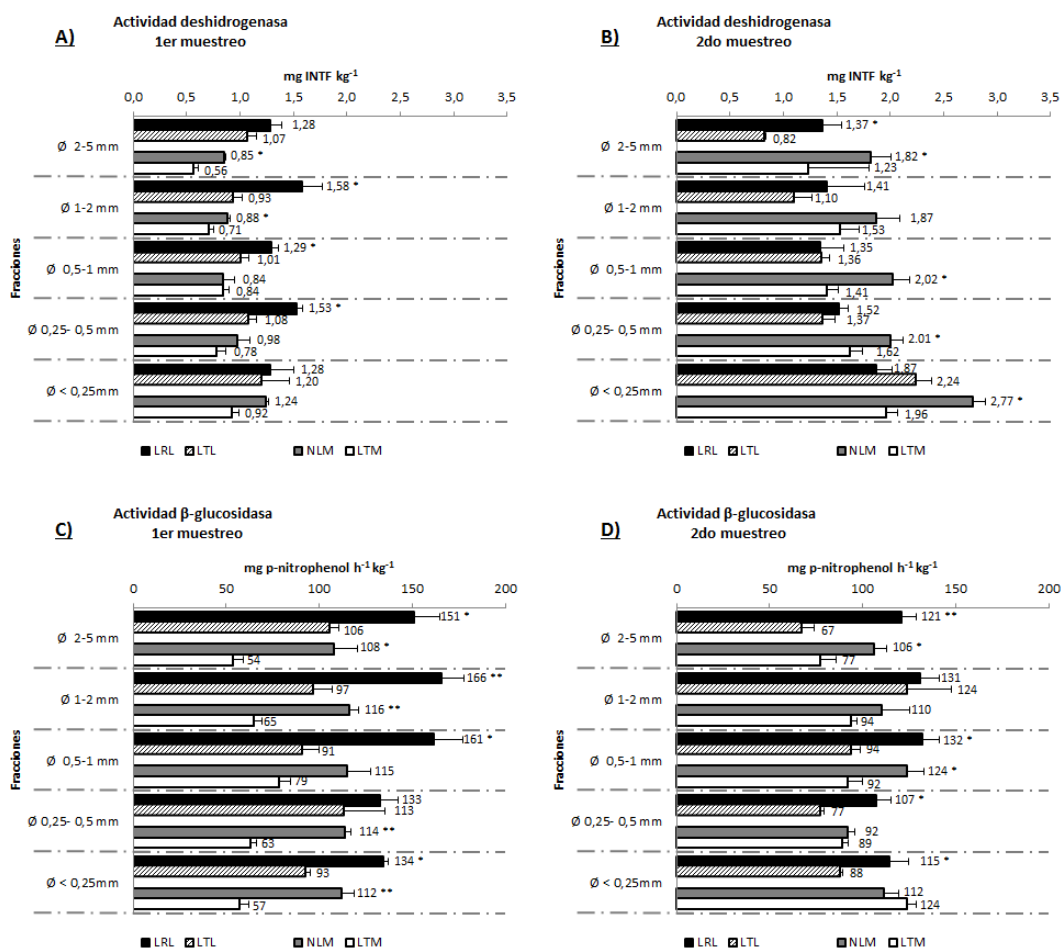


Figura IV.5. Parámetros bioquímicos obtenidos después del procedimiento fraccionamiento en seco del suelo ($\emptyset < 5\text{mm}$) de la finca “La Hampa” en mayo (E y G) y septiembre (F y H) de 2010. LR_L: laboreo reducido, experimento a largo plazo; LT_L: laboreo tradicional, experimento a largo plazo; NL_M: no-laboreo, experimento a medio plazo; LT_M: laboreo tradicional, experimento a medio plazo. Las diferencias significativas se indican con asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En la figura IV.5 se pueden apreciar mayores valores de actividades enzimáticas en los tratamientos de conservación, y en ambos muestreos, sobre todo en el caso de la β -glucosidasa, que mostró diferencias significativas en la mayoría de las fracciones analizadas. Los niveles de DHA fueron más altos en septiembre, probablemente por la elevada cantidad de residuos presentes después de la cosecha, mientras que la β -glucosidasa se mantuvo constante a lo largo de los dos muestreos.

Los análisis de RMN efectuados sobre muestras del 2º muestreo confirmaron que los tratamientos tradicionales tienden a almacenar una MO más degradada que los tratamientos de conservación, confirmado por la relación alquílicos/*O*-alquílicos,

que alcanzó valores más altos en las fracciones bajo LT de ambos ensayos, excepto que en la 2ª y 3ª fracción del ensayo a medio plazo (Figura IV.6).

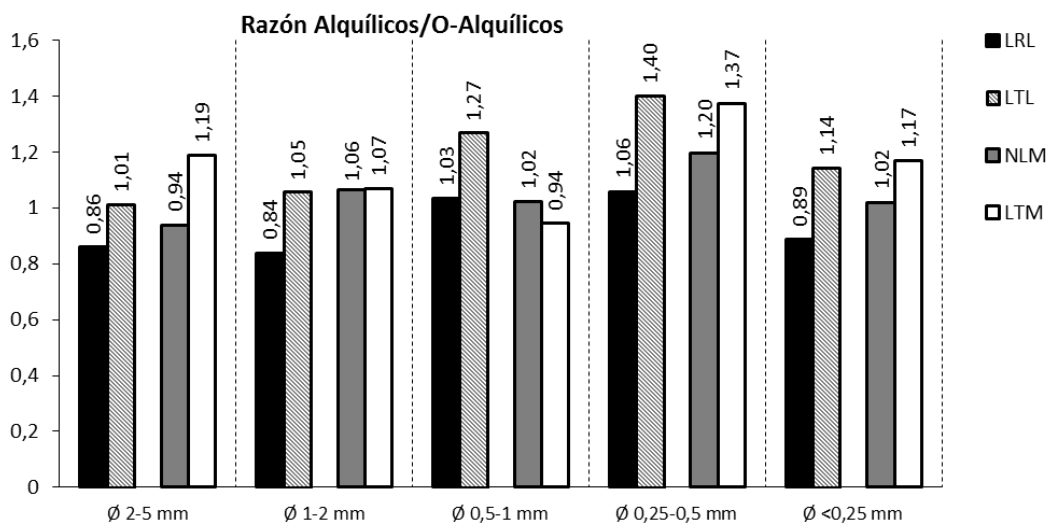


Figura IV.6. Razón entre las intensidades relativas de las regiones alquílicas y O-alquílicas obtenidas mediante integración de los espectros RMN. LR_L: laboreo reducido, experimento a largo plazo; LT_L: laboreo tradicional, experimento a largo plazo; NL_M: no-laboreo, experimento a medio plazo; LT_M: laboreo tradicional, experimento a medio plazo.

En la misma finca, con el objeto de profundizar en el conocimiento de la degradación de la MO y su relación con las actividades enzimáticas, así como en la fiabilidad de estas últimas, y otros parámetros bioquímicos, como índices de calidad de suelo, se realizó un estudio comparativo de los tres experimentos de larga, media y corta duración. Este estudio supuso la evaluación de cinco actividades enzimáticas (DHA, β -glu, PA, AS y PR), tres parámetros químicos relacionados con la MO (COT, MBC y CH) y distintas fracciones de suelo (suelo masivo “*bulk soil*”, AH, POM-L y POM-O) sometidas estas últimas a análisis sucesivos de ^{13}C CPMAS RMN. Los resultados obtenidos están incluidos en el trabajo “*Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence farm under different tillages evaluated by enzymatic activities and ^{13}C CPMAS NMR*” (apartado V.3).

Las diferencias más relevantes entre tratamientos se observaron en las muestras superficiales (0-5 cm) del ensayo de larga duración, donde el LR_L alcanzó valores significativamente más altos de todos los parámetros químicos y bioquímicos medidos, a excepción del CH y de la actividad proteasa (apartado V.3, tabla 2). También se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la profundidad de 5-10 cm para los parámetros COT, β -glu y AS.

En el ensayo de media duración, se detectaron diferencias significativas entre tratamiento en muestras superficiales y para los parámetros COT, β -glu, PA y AS. En el ensayo de corta duración las diferencias significativas se encontraron sólo esporádicamente; cabe destacar que bajo NL se alcanzaron valores significativamente más altos en superficie de β -glu y, en menor medida, de PA que bajo LR y LT, mientras que en las muestras de 5-10 y 10-25 cm esa tendencia se invirtió (apartado V.3, tabla 2).

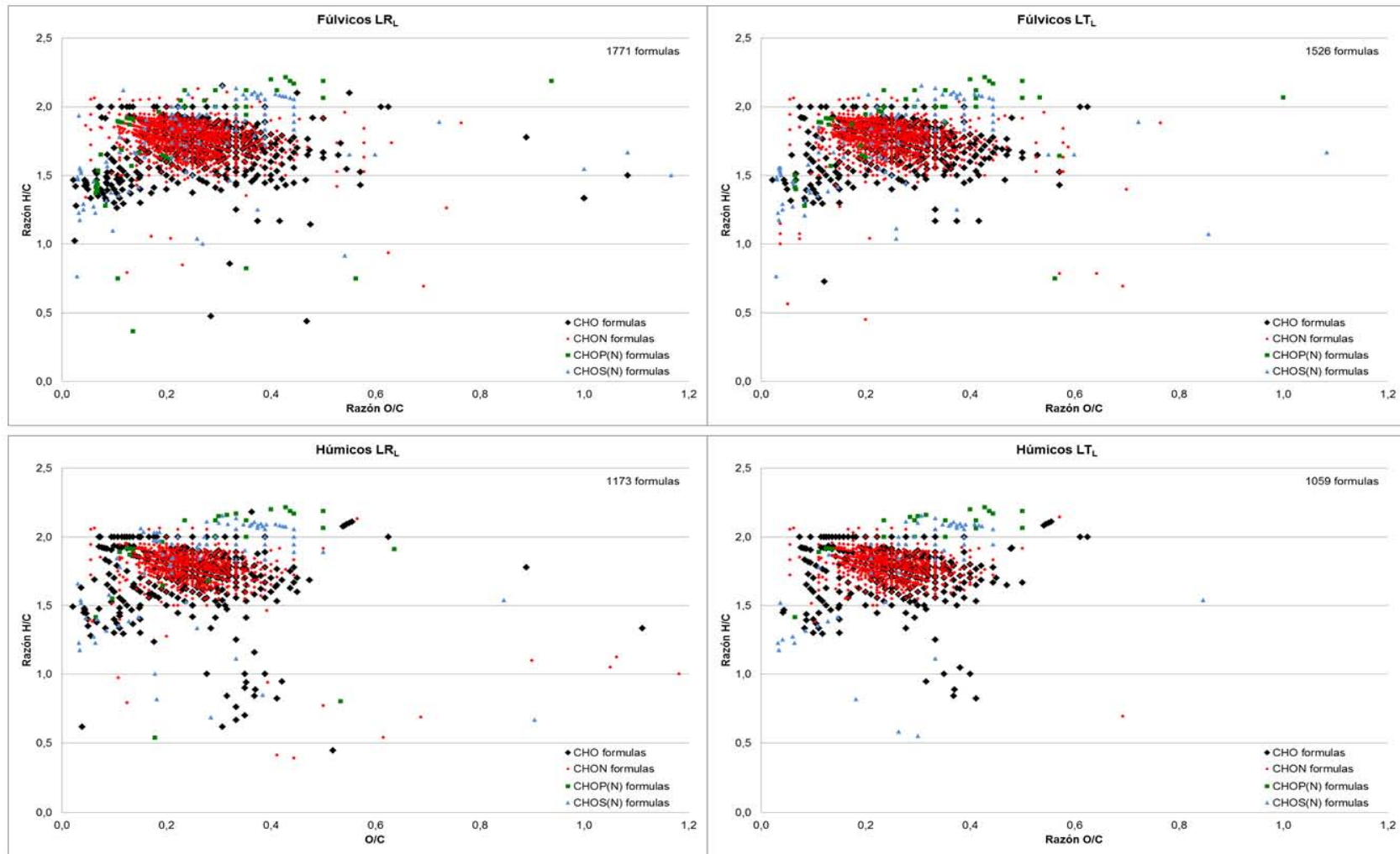
La tabla IV.2 reporta una estimación de la cantidad de carbono orgánico acumulado en los primeros 10 cm de profundidad. Análogamente a cuanto observado en la finca “Las Navas” (tabla IV.1), los tratamientos de conservación mostraron una mayor tendencia a acumular carbono en la capa superficial. En el ensayo de larga duración se observó una diferencia de 5 toneladas de C por hectárea en favor del LR_L, mientras que en el ensayo de media duración, la diferencia fue de alrededor de 4 toneladas por hectárea en favor del NL_M. En el ensayo de corta duración, se observaron diferencias algo menores en favor de NL_C y LR_C comparado con LT_C. López-Garrido *et al.* (2011) encontraron datos parecidos en los tratamientos de larga y media duración en muestras del 2008, y no observaron una redistribución de la MO en capas más profundas en los tratamientos LT.

Tabla IV.2. Carbono orgánico acumulado por tratamiento en los primeros 10 cm de suelos de la finca “La Hampa” en junio 2011.

<i>Experimento</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Densidad aparente</i> (g cm ⁻³)	<i>COT</i> (g kg ⁻¹)	<i>Carbono orgánico acumulado</i> (Mg ha ⁻¹)
Larga duración	LR _L	1,46	13,4	19,6
	LT _L	1,34	10,6	14,2
Media duración	NL _M	1,52	10,1	15,3
	LT _M	1,26	8,75	11,0
Corta duración	NL _C	1,63	9,60	15,6
	LR _C	1,49	8,75	13,0
	LT _C	1,41	8,65	12,2

Los análisis de RMN demostraron que las fracciones de MOP y sobre todo la MOP-L, contienen compuestos *O*-alquílicos procedentes de residuos frescos de cultivo, mientras que los ácidos húmicos contienen compuestos aromáticos y alquílicos más recalcitrantes (apartado V.3, figura 1, 2 y 3).

Figura IV.7 Diagramas de Van Krevelen correspondientes a los datos de extractos húmicos y fúlvicos del suelo de la finca “La Hampa” obtenidos por FT-ICR MS. LR_L: laboreo reducido, experimento a largo plazo; LT_L: laboreo tradicional, experimento a largo plazo.



La composición del suelo masivo fue más similar a la de los ácidos húmicos, con un elevado contenido en alquílicos y aromáticos. Generalmente, el suelo masivo y las fracciones MOP de las parcelas bajo LT demostraron mayores contenidos de aromáticos y alquílicos y un menor contenido de *O*-alquílicos que las correspondientes parcelas bajo NL y LR, mientras esta tendencia se invierte en las muestras de ácidos húmicos (apartado V.3, figura 1, 2 y 3). En las muestras de suelo masivo y de AH se observó un importante pico de *N*-alquílicos típico de material peptídico y aminoácidos.

Además de análisis por RMN, se llevaron a cabo análisis preliminares de espectrometría de masas FT-ICR de los ácidos húmicos y fúlvicos extraídos de las muestras de suelo de las parcelas del ensayo de larga duración, cuyos resultados se representan en la figura IV.7.

El potente instrumento utilizado permitió individuar alrededor de 1500-1700 compuestos distintos de ácidos fúlvicos y entre 1000 y 1200 de ácidos húmicos.

La representación mediante los diagramas de van Krevelen (1950) permite agrupar las moléculas según su relación hidrógeno/carbono en función de la relación oxígeno/carbono. Según estos diagramas, el material presente en ambas fracciones húmicas es parecido, con una conformación típica de residuos de biomasa y lignina. Las muestras de LR_L, tanto de húmicos como de fúlvicos, presentan un mayor número y una mayor variedad compuestos que las muestras correspondientes de LT_L.

IV.3. LABOREO DE CONSERVACIÓN Y USO DE HERBICIDAS: INFLUENCIA DEL GLIFOSATO SOBRE LOS BIOINDICADORES DE CALIDAD DEL SUELO.

Los resultados presentados en la publicación “*Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage*” del apartado V.4 evidenciaron que la aplicación del herbicida en las parcelas de NL_N y LR_N puede ocasionar un efecto estimulante sobre algunos de los parámetros bioquímicos comúnmente utilizados como indicadores de calidad del suelo. La intensidad y la duración de este efecto variaron considerablemente entre el ensayo llevado a cabo en condiciones de campo y el ensayo de incubación. Las figuras 1 y 2 del apartado V.4 muestran los resultados del ensayo de incubación, donde es evidente el aumento significativo de

los valores de CH, CBM, DHA y β -glu en las muestras donde se aplicó el glifosato, en comparación con los controles donde no se aplicó (LT_N). Los efectos del herbicida fueron evidentes hasta 57 días después de la aplicación. Por el contrario, las figuras 3 y 4 muestran los resultados obtenidos en el ensayo en condiciones de campo, donde el efecto de la aplicación del glifosato en las parcelas NL_N y LR_N se limitó a un incremento del CH en superficie (0-5 cm) y en profundidad (5-10 cm). Los demás parámetros analizados siguieron el mismo patrón tanto en las parcelas NL_N y LR_N, como en las parcelas LT_N, donde no hubo aplicación de herbicida.

IV. 4. LABOREO DE CONSERVACIÓN EN UNA PARCELA DE REGADÍO.

El ensayo llevado a cabo en la finca “Alameda del Obispo” dio origen a la publicación “*Effect of permanent bed planting combined with controlled traffic on soil chemical and biochemical properties in irrigated semi-arid Mediterranean conditions*” (apartado V.5).

La comparación de dos tipos de laboreo en una finca de regadío puso de manifiesto que el establecimiento de lomos permanentes (LP), con mayor acumulación de residuos en sus surcos, ocasionó niveles más altos de COT, N-Kjel y de actividades enzimáticas DHA y β -glu en los surcos (Apartado V.5, Tabla 3), comparado con las parcelas bajo el tratamiento de lomos tradicional (LT). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas de estos parámetros a nivel de lomos (Apartado V.5, Tabla 3).

Dependiendo del periodo de muestreo las diferencias fueron más o menos acusadas, debido a la diferente cantidad y tipología de los residuos (maíz y algodón). Por el contrario, el paso de la maquinaria no produjo efectos significativos (Apartado V.5, Tabla 1). El análisis de componentes principales confirmó que el COT, el N-Kjel y la β -glu fueron los parámetros que mejor describieron el estado del suelo, pudiendo ser considerados como indicadores fiables de calidad bajo estas condiciones experimentales, circunstancia que no se produjo en el caso del CH, un indicador muy utilizado en agricultura de secano.

IV.5. INDICES DE CALIDAD APLICADOS EN FINCAS COMERCIALES.

En todas las fincas evaluadas se determinaron, entre otros parámetros, los contenidos de COT y la actividad β -glu. Contrariamente a lo observado en los ensayos en parcelas experimentales, estos índices de calidad mostraron una elevada variabilidad a lo largo del estudio (Fig. IV.8 y IV.9). Este resultado refleja la normal variabilidad presente en el suelo y las diferentes prácticas agrícolas que se llevan a cabo en cada finca. En algunos casos, sus concentraciones en parcelas bajo laboreo tradicional llegaron a igualar, e incluso superar, en superficie, los contenidos registrados en parcelas bajo laboreo mínimo. Analizando estos datos y los informes redactados por los agricultores, se observa que la percepción de “laboreo mínimo” y de “laboreo convencional” es muy variable según el agricultor de que se trate, siendo imposible distinguir estos dos tratamientos con claridad. El manejo de los residuos, efectuado de forma discontinua y según criterios económicos más que medioambientales, es quizás uno de los factores que más pueden haber influido en la falta de respuesta de los índices de calidad de suelo aplicados. Se trata no obstante de un aspecto que, entre otros factores (como la profundidad de muestreo), debe ser abordado en futuros estudios.

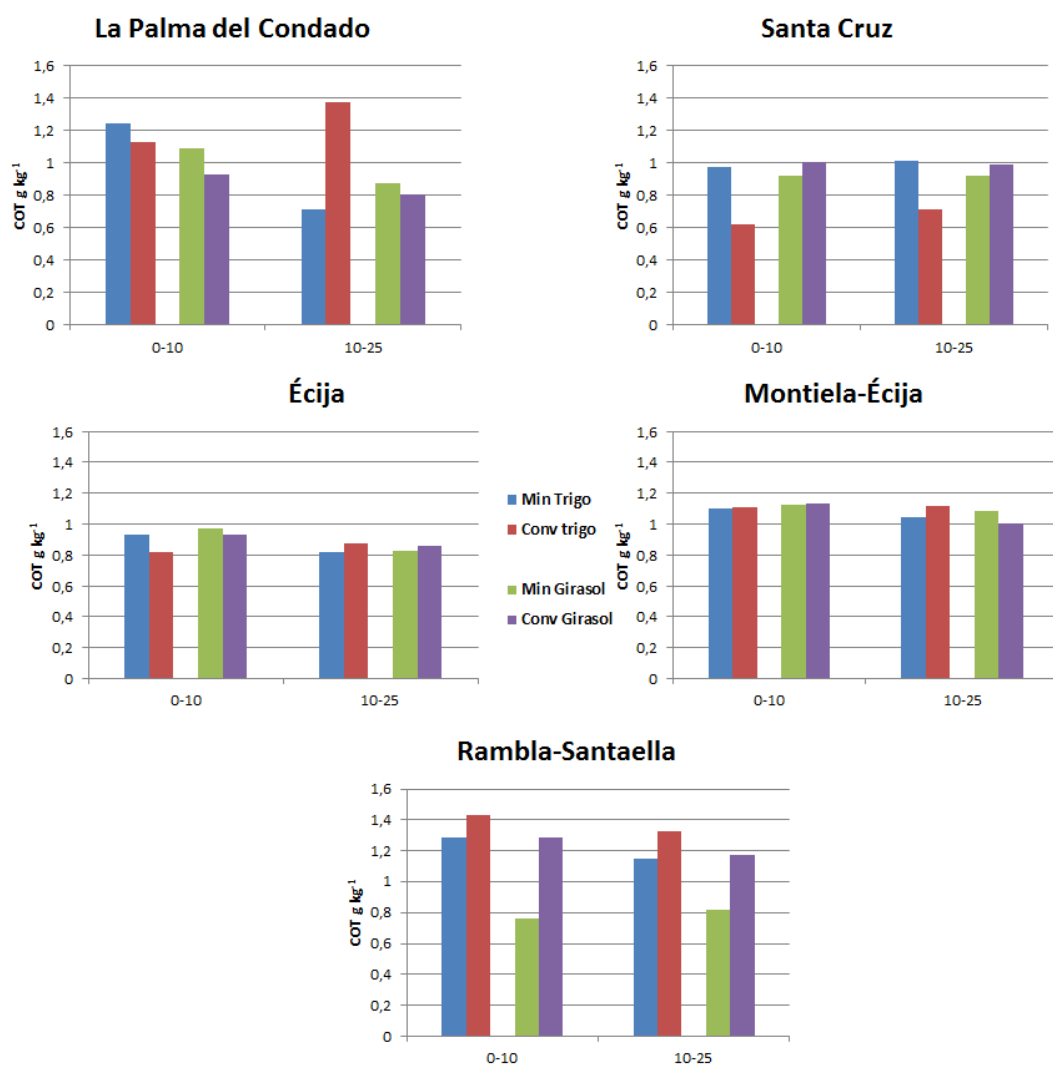


Figura IV.8. Valores medios de carbono orgánico total obtenidos en 2011 en fincas comerciales bajo laboreo mínimo (Min) y convencional (Conv) y rotación de cultivos trigo-girasol. (Carmona *et al.*, en preparación).

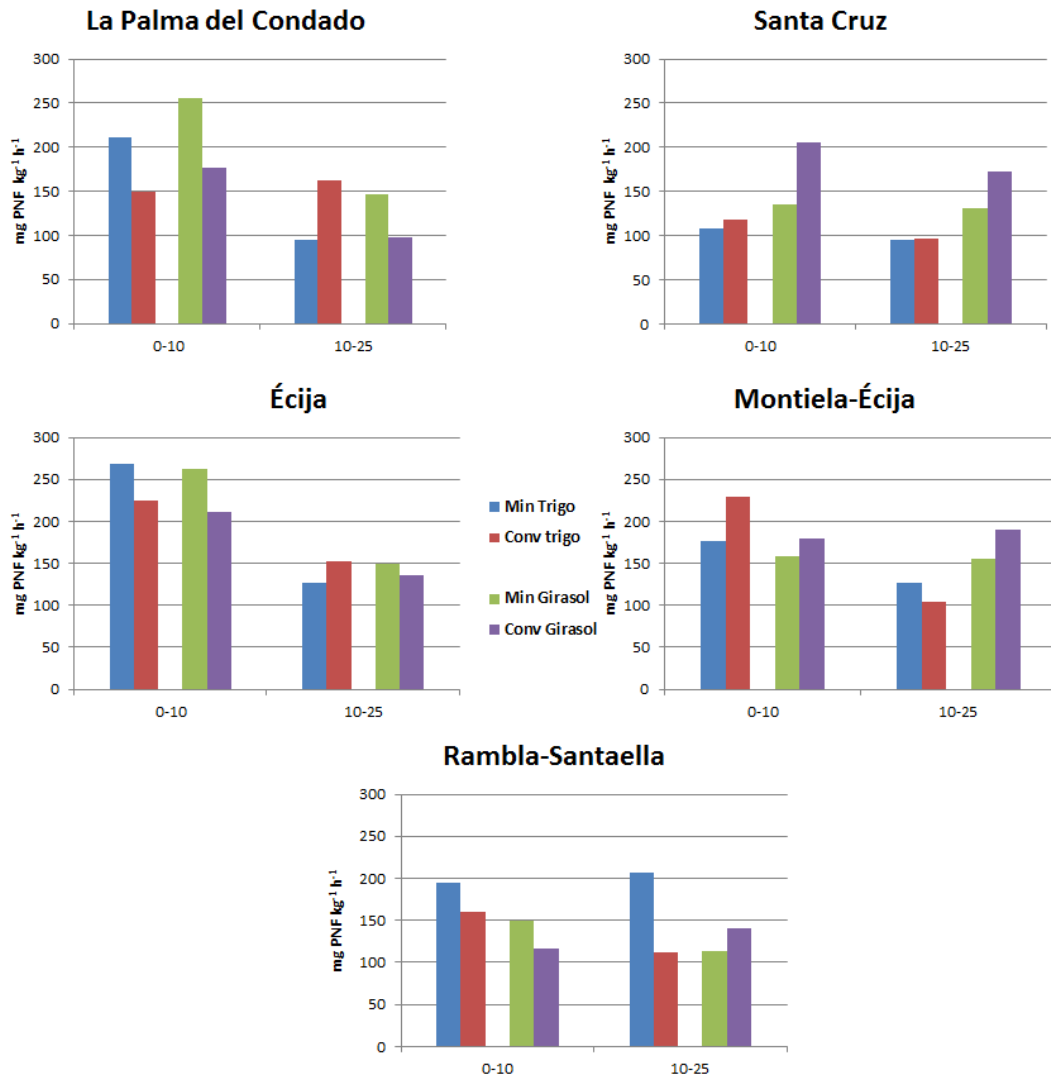


Figura IV.9. Valores medios de β -glucosidasa obtenidos en 2011 en fincas comerciales bajo laboreo mínimo (Min) y convencional (Conv) y rotación de cultivos trigo-girasol. (Carmona *et al.*, en preparación).

V. Publicaciones
científicas

V.1. IMPLEMENTATION OF CHISELLING AND MOULDBOARD PLOUGHING IN SOIL AFTER 8 YEARS OF NO-TILL MANAGEMENT IN SW, SPAIN: EFFECT ON SOIL QUALITY.

Resumen

Implementación de una labor de chisel y de vertedera en un suelo después de 8 años de manejo bajo no-laboreo en el SO de España: Efectos sobre la calidad del suelo.

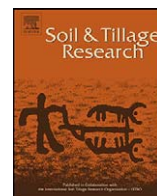
Las prácticas de no-laboreo (NL) producen un efecto positivo en la recuperación y la mejora de la fertilidad del suelo y disminuyen la erosión. Sin embargo, esas prácticas pueden también causar algunos inconvenientes, como compactación del suelo, y problemas en la germinación de las semillas. En este trabajo se evalúan los efectos de la implementación (en octubre 2008) de un laboreo tradicional (vertedera, LT) y de un laboreo reducido (chisel, LR) sobre la calidad de un suelo calizo (Leptic Typic Xerorthent) en condiciones de secano después de 8 años de manejo bajo NL en el suroeste de España.

Nuestra hipótesis es que las fracciones de C y las propiedades bioquímicas pueden ser consideradas como indicadores adecuados de los cambios en la calidad del suelo. Para evaluar la hipótesis, se tomaron muestras a tres profundidades (0–5, 5–10 and 10–25 cm), después de las labores y de la siembra de un cultivo de veza (*Vicia sativa*, L.) (enero 2009), después de su cosecha (junio 2009) y tras las labores y siembra de un cultivo de trigo (*Triticum aestivum*, L.) (enero 2010). Se determinaron el carbono orgánico total (COT), las fracciones lábiles de carbono como el carbono activo (POxC) y el carbono hidrosoluble (CH). La bioquímica del suelo se evaluó mediante el análisis del carbono y del nitrógeno de la biomasa microbiana (CBM y NBM) y de las actividades enzimáticas [deshidrogenasa, (DHA), y β -glucosidasa (β -glu)].

En los primeros 5 cm de suelo, la implementación del LR no causó ninguna disminución en la mayoría de las propiedades del suelo estudiadas, con respecto al NL. No obstante, la aplicación del LT redujo un 23% el contenido de COT, un 27%

el de CH, un 12% el de POxC, un 19% el de CBM, un 44% el de NBM, un 37% el valor de DHA y un 51% el de β -glu en el suelo superficial (0-5 cm), en relación con el NL. Los valores de carbono orgánico y los parámetros microbiológicos disminuyeron en todos los muestreos con el aumento de la profundidad, particularmente en los tratamientos de conservación (LR y NL).

Bajo nuestras condiciones de secano en áreas Mediterráneas, la vertedera no se puede considerar un sistema de manejo viable, dado que demostró tener un efecto negativo a corto plazo sobre las fracciones orgánicas y la calidad bioquímica del suelo. La utilización de chisel si puede ser considerada como una solución viable para los problemas que pudieran derivarse del no-laboreo, aunque todavía son necesarios estudios posteriores en este sentido.



Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in SW, Spain: Effect on soil quality

S. Melero^{a,*}, M. Panettieri^a, E. Madejón^a, H. Gómez Macpherson^b, F. Moreno^a, J.M. Murillo^a

^a Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), Sevilla, Spain

^b Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2010

Received in revised form 16 December 2010

Accepted 16 December 2010

Available online 20 January 2011

Keywords:

Sustainable agriculture

Dryland

Active carbon

Soil microbial biomass

Enzyme activities

ABSTRACT

Long-term no-till practices (NT) have a positive effect on recovery and improving soil fertility and decreasing soil erosion. Nevertheless, long term no-till practices may also cause some inconveniences, such as soil compaction, water infiltration and problems in seed germination. Thus, in the present work we assess the effects of the implementation (October 2008) of a traditional tillage (mouldboard ploughing) (TT) and reduced tillage (chiselling) (RT) on soil quality in a dryland calcareous soil (Leptic Typic Xerorthent) after 8 years of soil no-till management (NT) in SW Spain. The results were compared to those found under no-till. We hypothesised that C fractions and biological properties would be adequate indicators of soil quality changes. To test the hypothesis soil samples were collected at three depths (0–5, 5–10 and 10–25 cm) and in three sampling periods, after tillage and sowing (January 2009) after harvesting (June 2009) a vetch crop (*Vicia sativa*, L) and after tillage and sowing (January 2010) of a wheat crop (*Triticum aestivum*, L). Total organic carbon (TOC) and carbon labile fractions (active carbon (AC) and water soluble carbon (WSC)) were determined. Biological status was evaluated by the analysis of soil microbial biomass carbon and nitrogen (MBC and MBN) and enzymatic activities [dehydrogenase activity (DHA), and β -glucosidase activity (Glu)]. The implementation of chiselling did not cause depletion in most of the studied soil properties compared to no-till in the first 5 cm of soil. However, the application of traditional tillage reduced 23% of TOC, 27% of WSC, 12% of AC, 19% of MBC, 44% of MBN, 37% of DHA and 51% of Glu in the upper layer of the soil (0–5 cm depth) with respect to no-till. Soil organic carbon and microbial parameter values decreased as depth increased, particularly in conservation tillage systems (RT and NT) in all sampling periods. Under our conditions, dryland Mediterranean areas, the mouldboard ploughing is not considered a suitable soil tillage system since it showed an early negative effect on soil organic fractions and biochemical quality. Although further studies would be necessary, the use of chiselling could be a solution in case of problems related to no-till.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of land for agricultural purposes is one of the main causes of soil degradation, and therefore there is a relevant interest in quantifying the loss of soil quality generated by agricultural management (Lal et al., 1998). Among different agricultural practices, conservation agriculture maintains the preservation of soil structure, productivity and biodiversity through three basic principles: minimum tillage, cover crops and crop rotation (ECA, 1999). There is a growing trend worldwide for the adoption of conservation tillage systems (no-till and reduced tillage), especial-

ly in tropical and semi-arid agroecosystems (Baudoin et al., 2009). Conservation tillage has numerous positive effects on soil, such as improvement of water-holding capacity, and reduction of soil erosion. Moreover costs are also reduced because of the lower fuel and labour inputs (Lindwall and Anderson, 1981).

In sustainable agricultural production systems, the maintenance of quantity and quality of soil organic matter is of great importance, since the recover of organic matter levels is slow and not easily achieved (Eswaran et al., 1993). The reduction of soil disturbance decreases mineralization of soil organic matter and it can result in larger storage of soil organic C (West and Post, 2002; Al-Kaisi et al., 2005). Several studies have shown the positive effect of no-till on improving soil physical, chemical and biological properties (Moreno et al., 1997; Cantero-Martínez et al., 2003; Acosta-Martínez et al., 2007; Melero et al., 2009a,b) compared to traditional tillage. Furthermore, the improvement of soil structure allows better soil aeration and water infiltration, and the

* Corresponding author at: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), Avenida Reina Mercedes 10, P.O. Box 1052, 41080 Sevilla, Spain. Tel.: +34 954624711; fax: +34 954624002.

E-mail address: smelero@irnase.csic.es (S. Melero).

preservation of a surface cover of residue enhances microbial activity and soil microbial biomass content (Doran et al., 1998).

These improvements in soil quality can also increase soil microbial diversity, thus protecting crops against pests and diseases through competition by soil nutrients and water supply (Brussaard et al., 2007).

However, long term no-till practices can also lead to soil compaction, which could affect water infiltration and seed germination. Therefore, the introduction of chisel or mouldboard ploughing may solve those problems. Nevertheless, the effect of soil tillage depends on its frequency, depth and soil texture (Six et al., 2002; Cookson et al., 2008).

In this sense, scarce information have been published about the effects of the implementation of mouldboard ploughing or chiselling on the quality of soil managed by no-till practices for a long time. Even though all physical, chemical, biological and biochemical properties are involved in soil functioning, biological and biochemical properties respond more quickly than other soil properties to changes produced by different soil management (Visser and Parkinson, 1992; Trasar-Cepeda et al., 2008). Also, the labile fractions of total organic carbon (TOC), such as active carbon are more available sources of carbon for soil microorganisms, and therefore influence nutrient cycles and many biologically related soil properties. Active organic C includes microbial biomass C (MBC), particulate organic matter and carbohydrates (Weil et al., 2003).

In general, the long-term effects of soil management practices on the size and activity of the microbial biomass have been closely related to soil organic matter content (Haynes and Beare, 1996), whereas short-term effects are more complex and also depend on soil conditions such as soil texture, climate, cropping system and the kind of crop residue, as well as on the management itself (Paustian et al., 1997; Al-Kaisi et al., 2005; Muñoz et al., 2007).

The objective of this work was to study the effects of a mouldboard ploughing and chiselling application on soil properties of a not tilled field for 8 years. We hypothesised that mouldboard ploughing and chiselling could affect soil quality. To test this hypothesis, soil organic C fractions (total organic carbon, active carbon and water soluble carbon) and biochemical properties (microbial biomass carbon and microbial biomass nitrogen and enzymatic activities (β -glucosidase and dehydroge-

nase) were analysed in order to evaluate the possible damage that those tillage systems could cause to soil quality.

2. Materials and methods

2.1. Site characteristics and tillage systems

This field experiment was established in 2008 at the “Las Navas” dryland experimental farm in Jerez de la Frontera (Cádiz, SW Spain) ($36^{\circ}50'29.92''\text{N}$, $5^{\circ}55'11''\text{W}$) in a clay loam soil (323 g kg^{-1} sand, 315 g kg^{-1} silt and 352 g kg^{-1} clay) classified as a Leptic Typic Xerorthents (Soil Survey and Staff, 2006), with a carbonate content of 60%, pH of 8 and a organic carbon content of 1.5%. Leptosols (very widespread in the Mediterranean zone) are soils characterized by shallow depth or high stoniness, and limited soil volume makes them very vulnerable (Ryan et al., 2006). The climate of the zone is typically Mediterranean, with mild rainy winters (599 mm mean rainfall) and very hot and dry summers. The mean annual daily temperature is around 17.5°C , with the higher maximum and the lower minimum temperatures registered of 41°C and -4°C in July and January, respectively. Temperature and rainfall during experiment are shown in Fig. 1.

This commercial farm has been managed by the Spanish Association of Conservation Agriculture (AEAC.SV) under no tillage system over the previous eight years (from autumn 1999 to spring 2008), except in 2006 when a shallow disc harrowing was used in order to control weed. During this time the following crops were grown: Wheat (*Triticum aestivum* L. (in 1999 and 2002); *Triticum durum* Desf. (in 2001, 2004, 2006 and 2007) and sunflower (*Helianthus annuus* (in 2000, 2003 and 2005).

In October 2008, the experimental site was divided into 9 plots of $30 \text{ m} \times 10 \text{ m}$, with a 2.5 m corridor between plots. Three treatments were established: traditional tillage (TT), reduced tillage (RT) and no tillage (direct drilling) (NT), identical to the procedure used during the last 8 years, which was used as control treatment. The experiment was carried out in a completely randomised block design with three replicates per treatment.

The TT consisted of mouldboard ploughing (to a 25 cm depth) without residue, while RT consisted of the reduction of the number of tillage operations (only chiselling, 10–15 cm depth) and in NT no

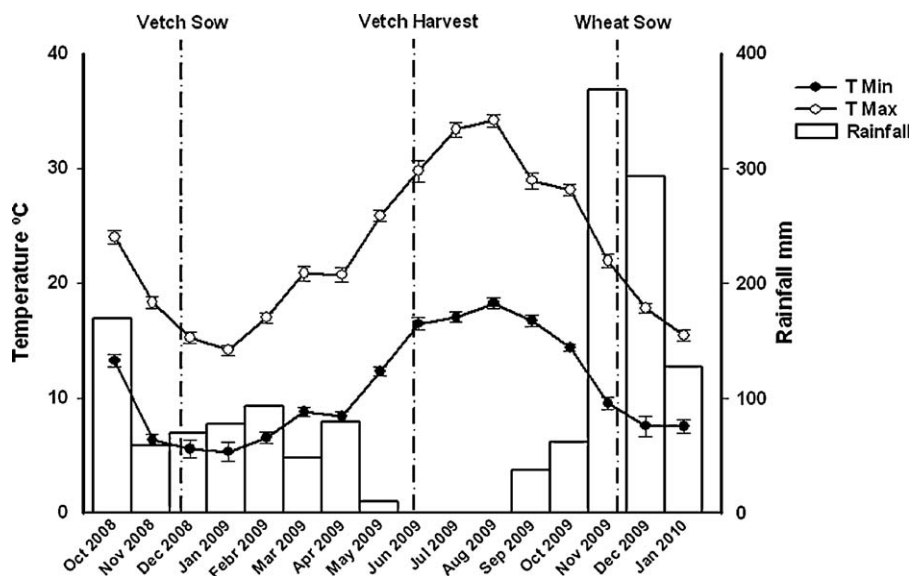


Fig. 1. Mean maximum and minimum temperature and rainfall during experimentation period.

tillage was used. In both conservation tillage (RT and NT) the soil was covered (>30% surface) with previous crop residues.

The crop rotation of this experiment was a legume-cereal rotation. The soil was fertilized similarly in all treatments. Fertilization in vetch crop consisted of a basal dressing of 70 kg P₂O₅ ha⁻¹, whereas in wheat crop was a basal dressing of 36 kg N ha⁻¹ and 92 kg P₂O₅ ha⁻¹ and a top dressing of 250 kg ha⁻¹ 1 of urea (46%), following the regular practices of the local farmers. The seeds density was 125 and 220 kg ha⁻¹ and plants density was 165 and 300 plants m⁻² for vetch and wheat, respectively. In both crops, the distance between crop rows was 17 cm and the number of rows was 36 per plot.

Weeds were controlled in TT by tillage and in RT and NT by the application of pre-emergence herbicides at a rate of 2 L ha⁻¹ glyphosate.

2.2. Sampling and soil chemical and biochemical analysis

Soil samples were collected at three depths (0–5, 5–10 and 10–25 cm) and in three sampling periods: after tillage and seeding in January 2009 and 2010 and after harvesting a vetch crop in June 2009 (*Vicia sativa* L.). From each plot three soil samples were taken for further analysis. Each soil sample consisted of 9 individual soil cores. The field-moist soil was sieved (2 mm), homogenized and then divided in two subsamples: one was air-dried for various chemical analyses; a second subsample was stored at 4 °C in plastic bags for analysis of microbial biomass and enzymatic activities.

In air-dried subsamples, TOC was analysed by dichromate oxidation and titration with ferrous ammonium sulphate (Walkley and Black, 1934). WSC was determined in a (1/10) aqueous extract by shaking at 150 rev min⁻¹ 1 h. The aqueous extract was centrifuged at 48,400 × g for 10 min and measured using a TOC V-CSH Shimadzu analyzer (Bastida et al., 2007). Active carbon (AC) was determined by oxidation of 5 g of dry weight soil with 2 ml of 0.2 M KMnO₄ in 1 M CaCl₂ (pH 7.2) and non-reduced Mn⁷⁺ was colorimetrically determined at 550 nm (Weil et al., 2003).

In moist-field subsamples MBC and MBN content was determined by the chloroform fumigation-extraction. A K_{EC} of 0.172 was used to calculate MBC (Gregorich et al., 1990) and a K_{EN} of 0.54 was used to calculate MBN (Brookes et al., 1985). Dehydrogenase activity was determined according to Trevors (1984) after soil incubation with iodonitrotetrazolium chloride (INT) and measurement of iodonitrotetrazolium formazan (INTF) absorbance at 490 nm. β-Glucosidase activity was measured as indicated by Eivazi and Tabatabai (1988). Results were based on the oven-dried weight of the soil.

2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using SPSS 15.0 for Windows and the results were expressed as mean values. The results were analysed by ANOVA considering the management systems (TT, RT and NT) as the independent variable. Significant statistical differences of all variables between the different management systems were established by the Tukey test at $p < 0.05$.

The correlation matrix of different properties was based on Pearson correlation coefficients ($p < 0.01$ and $p < 0.05$).

3. Results

Values of TOC, WSC and AC were higher, although not always significantly, in NT and RT compared to TT in the 0–5 cm layer in the most of samplings (Table 1). The implementation of TT, mouldboard ploughing, caused a decrease in all the C fractions in soil that represented a reduction in TOC, WSA and AC at 23, 27 and

Table 1
Mean values of total organic carbon (TOC), water soluble carbon (WSC), active carbon (AC), microbial biomass carbon (MBC) and microbial biomass nitrogen (MBN) in soil under no tillage (NT), reduce tillage (RT) and traditional tillage (TT) at three depths (0–5, 5–10 and 10–25 cm) during three sampling period of experimentation.

Parameters	Treatments	After tillage (January 2009)			After harvesting (June 2009)			After tillage (January 2010)		
		0–5 cm	5–10 cm	10–25 cm	0–5 cm	5–10 cm	10–25 cm	0–5 cm	5–10 cm	10–25 cm
TOC (g kg ⁻¹)	NT	18.3 (±0.8) b	14.2 (±1.2)	13.5 (±0.7)	20.0 (±1.5) b	13.3 (±1.2)	10.7 (±1.1)	19.3 (±2.1)	17.5 (±1.8)	11.4 (±1.6)
	RT	16.9 (±0.9) ab	13.8 (±1.3)	11.4 (±1.8)	20.2 (±1.7) b	15.1 (±1.6)	10.6 (±1.2)	20.6 (±1.2)	16.9 (±1.3)	10.0 (±1.6)
	TT	13.7 (±1.1) a	14.4 (±1.4)	14.0 (±1.1)	14.5 (±1.1) a	15.0 (±1.2)	11.5 (±1.4)	14.9 (±1.6)	15.1 (±1.4)	12.1 (±2.2)
WSC (mg kg ⁻¹)	NT	66.0 (±4.4) b	54.4 (±2.0) b	52.3 (±4.6) a	296 (±32)	112.1 (±8.9)	67.5 (±3.8)	109.5 (±8.6) b	93.3 (±4.7) ab	69.8 (±9.3)
	RT	87.0 (±4.2) c	68.7 (±4.6) a	70.5 (±6.1) b	291 (±39)	128.2 (±17.7)	81.9 (±7.3)	111 (±10.2) b	105 (±6.8) b	74.3 (±10.2)
	TT	48.2 (±3.9) a	57.8 (±3.9) ab	54.3 (±2.2) ab	237 (±26)	101.7 (±8.2)	69.5 (±4.9)	79.5 (±5.6) a	84.3 (±3.6) a	77.0 (±8.5)
AC (mg kg ⁻¹)	NT	1389 (±7) b	1263 (±111)	1259 (±112)	1395 (±12) b	1373 (±8) b	1356 (±9) b	1409 (±4)	1398 (±9)	1379 (±10) b
	RT	1380 (±7) b	931 (±146)	913 (±145)	1048 (±50) ab	927 (±138) a	801 (±109) a	1411 (±7)	1271 (±113)	923 (±144) a
	TT	928 (±145) a	930 (±144)	815 (±113)	928 (±139) a	930 (±139) a	808 (±110) a	1243 (±113)	1275 (±113)	1042 (±152) ab
MBC (mg kg ⁻¹)	NT	940 (±42)	704 (±65)	728 (±53)	1612 (±283) ab	995 (±223)	705 (±156)	445 (±48) b	338 (±30)	199 (±39)
	RT	901 (±81)	736 (±64)	583 (±101)	2363 (±218) b	1075 (±193)	994 (±190)	458 (±25) b	289 (±50)	120 (±28)
	TT	724 (±147)	678 (±79)	765 (±67)	957 (±258) a	965 (±154)	668 (±90)	263 (±22) a	274 (±33)	178 (±39)
MBN (mg kg ⁻¹)	NT	32.8 (±6.6)	36.1 (±5.1)	30.5 (±4.2)	40.4 (±10.9) ab	51.3 (±21.0)	22.9 (±8.0)	31.0 (±5.9) b	21.8 (±3.77)	8.97 (±1.76)
	RT	45.6 (±5.7)	38.0 (±9.9)	28.6 (±4.0)	68.6 (±12.4) b	33.0 (±4.5)	27.0 (±7.8)	36.9 (±3.2) b	22.2 (±3.9)	9.27 (±2.12)
	TT	40.1 (±11.3)	33.7 (±7.1)	25.7 (±6.4)	25.4 (±5.8) a	30.7 (±6.3)	21.3 (±3.0)	17.2 (±2.1) a	18.5 (±3.5)	9.44 (±1.76)
MBC/TOC%	NT	5.20	5.06	5.40	8.28	8.08	6.94	2.41	2.01	1.69
	RT	5.33	5.67	5.70	11.6	7.70	10.8	2.26	1.69	1.17
	TT	5.35	5.30	5.70	6.71	6.78	6.13	1.84	1.84	1.51

12%, respectively related to the content in soil under NT at the first layer (0–5 cm) in the last sampling (Table 1). Similar percentages of decrease were recorded for the two first samplings. However, values of TOC, WSC and AC obtained in soils under RT, chiselling, were similar to those obtained in NT (Table 1).

Results of organic matter content (TOC, AC and WSC) in deeper layers were very similar between NT and TT treatments and significant differences between them were not found (Table 1). Except in the second sampling (June 2009), in which the values of AC were significantly higher under NT than TT in deeper layers (5–10 and 10–25 cm).

C and N values of the microbial biomass in the first layer (0–5 cm) were higher under NT and RT treatments than in TT,

although significant differences between treatments were only found in the last sampling (January 2010) (Table 1). Despite the high decrease observed for the last sampling, values of MBC were higher in NT and RT than in TT. Also, values of MBN were higher in conservation tillage than in conventional tillage. As occurred for organic carbon fractions values of MBC and MBN in deeper layers were similar and significant differences between treatments were not found (Table 1).

Values of MBC/TOC ratio were similar for all treatments and samplings at the different depths studied. Values of the DHA and Glu are presented in Figs. 2 and 3, respectively. For both activities, and especially at 0–5 cm, values were significantly higher under NT than under TT. Accordingly, with the decrease observed in the third

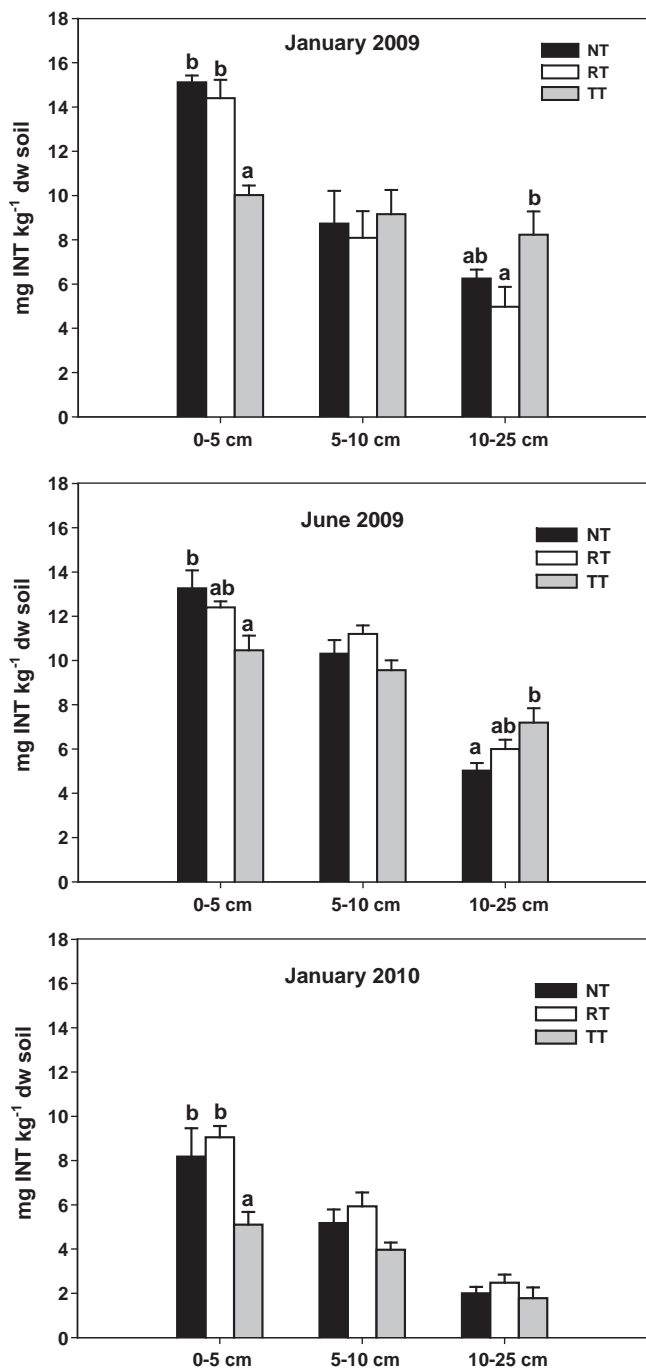


Fig. 2. Mean values of dehydrogenase activity. Significant differences between treatments are indicated with different letter ($p < 0.05$). Vertical bars are standard errors. NT: no tillage, RT: reduced tillage; TT: traditional tillage.

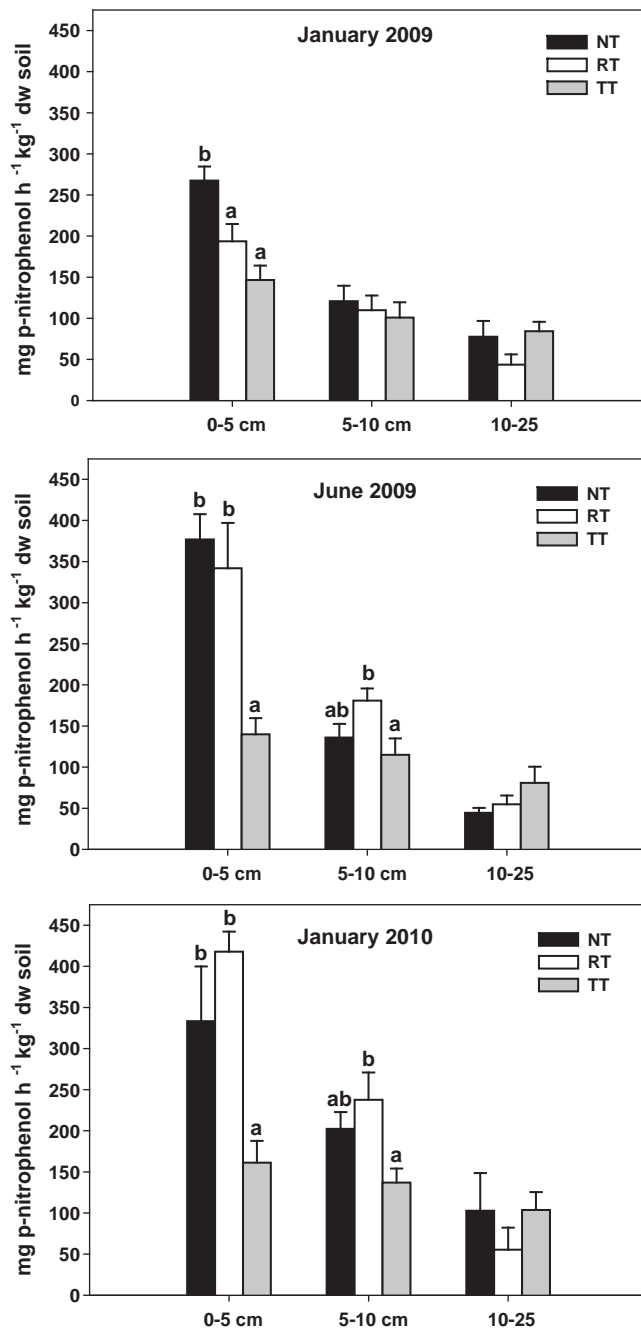


Fig. 3. Mean values of Glucosidase activity. Significant differences between treatments are indicated with different letter ($p < 0.05$). Vertical bars are standard errors. NT: no tillage, RT: reduced tillage; TT: traditional tillage.

Table 2

Correlation coefficients between the different soil chemical and biological properties.

	WSC	AC	MBC	MBN	DHA	GLU
TOC	0.398**	0.495**	0.270**	0.327**	0.427**	0.708**
WSC		0.091	0.616**	0.354**	0.408**	0.513**
AC			−0.111	0.037	0.071	0.419**
MBC				0.686**	0.595**	0.315**
MBN					0.475**	0.342**
DHA						0.446**

$n = 243$. TOC: total organic carbon; WSC: water soluble carbon; AC: active carbon; MBC: microbial biomass carbon. MBN: microbial biomass nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; Glu: glucosidase activity.

*Correlation is significant at the 0.05 level.

** Correlation is significant at the 0.01 level.

sampling for MBC values, a decrease of DHA values was recorded in the same sampling. As for the other parameters analysed, values of enzyme activities decreased with depth.

Bivariate correlations indicated that TOC showed a high positive correlation with WSC, AC, microbial biomass carbon and nitrogen and enzymatic activities (Table 2). Microbial biomass was also found to be significantly and positively correlated with WSC and enzymatic activities (DHA and Glu) and they were correlated among each other. However, there was not any correlation among AC and microbial biomass and WSC, which are components of AC fraction.

4. Discussion

The maintenance and increase of quality and quantity of soil organic matter is relevant in sustainable agriculture (Eswaran et al., 1993). Several years are necessary to have noticeable C storage under conservation management. However conservation tillage and especially no-tillage could lead, after long times of implementation to some inconveniences, such as soil compaction, water infiltration and problems in seed germination. When this occurs, the farmer is faced with the dilemma of whether to plough to restructure the soil (risking organic matter losses and killing soil fauna) or to persist with the no tillage and suffer yield losses. This situation has promoted many farmers in SW Spain to apply a occasional tillage (mouldboard ploughing or chiselling) to prevent those problems. Little information is available about the effects of these tillage practices on the quality of soil especially when they are vulnerable to erosion.

In general, our results are in agreement with our hypothesis showing chiselling maintained the levels of soil organic carbon accumulated during 8 years of no-till management. In contrast, the implementing of mouldboard ploughing management in plots under eight years of no tillage had an immediate negative effect on soil organic carbon fraction contents and biomass and microbial activity, especially in the first 5 cm of soil depth. These results are in line with those obtained by other authors (De la Horra et al., 2003; Muñoz et al., 2007; Madejón et al., 2007; Moreno et al., 1997; Qin et al., 2010).

The highest accumulation of crop residues on the soil surface and no soil disturbance under no-till residue-soil contact reduces the decomposition of structural plant constituents by microorganism. However, ploughing modifies the soil structure by decreasing soil bulk density and increasing aeration, the soil water content which is evaporate and the accessibility of crop residues for soil microbes, enhances soil organic matter mineralization (Doran and Smith, 1987; Prosser, 2002; Roldan et al., 2005; Czyz and Dexter, 2008). Indeed, Sarathchandra et al. (1989) reported that mineralization of organic matter is affected by macroclimate, the water content of soil, soil temperature regimes, input of C through roots

and crop residues. Besides, the increase of carbon storage in no-till soils may be related to better stabilisation and formation of macroaggregates under conservation tillage, which offer protection of soil organic matter from its degradation (Paustian et al., 2000; Six et al., 2002).

Several authors have reported higher microbial biomass contents and enzymatic activities under soil conservation tillage management than under traditional tillage management (Doran 1980; Eivazi et al., 2003; Madejón et al., 2007; Melero et al., 2009a,b; Qin et al., 2010). These results may be also related to high input of C sources through crop residues left on the surface, which stimulate the growth and activity of soil microorganisms (Steenwerth and Belina, 2008). Besides, those results could also be related to the protection and stabilisation of organic matter by soil microbial biomass and enzymatic activities (Pascual et al., 1997). Indeed, our results indicated that soil microbial biomass and enzymatic activities are closely correlated ($p < 0.01$) to organic carbon fractions. Similar correlations were obtained by other authors (Beyer et al., 1993; Eivazi et al., 2003). Soil conservation management improved the organic matter status of soils, which was in turn reflected in the higher enzymatic activity, especially those related to the transformation of organic matter, such as β -glucosidase (De la Horra et al., 2003).

Also, differences in enzymatic activity values between tilled and no-till soils may be due to changes in the populations of aerobic and facultative anaerobic microorganisms. Thus, no-till soils tend to have biochemical environments less oxidative than tilled soils (Eivazi et al., 2003).

Several authors (Schloter et al., 2003; Feng et al., 2003) reported that seasonal changes affected soil microbial communities in agroecosystems. Schloter et al. (2003) found that in summer microbial communities are reduced due to the low water content and the high temperature in the topsoil. However, in our studies we have found higher Glu activity and microbial biomass content in early summer. In this case soil temperature was not very high and the moisture content was adequate. Also, due to root exudates and root and crop residues left in the soil after harvesting a leguminous crop improve the microbiological status of the soil (Feng et al., 2003). In fact, although MBC/TOC ratios did not vary between tillage systems, a great increase in MBC/TOC values in conservation tilled soils (RT and NT) was observed after harvesting, especially at 0–5 cm depth. These results may be explained by the fact that no- and reduce-tilled soils have more input of labile organic substrates after harvesting, which allows a higher MBC per unit of soil C compared to tilled soils. MBC/TOC is an indicator of C availability by microorganisms and of input and losses of organic matter, conversion efficiency to microbial biomass (Sparling, 1992).

A decrease in MBC/TOC ratio, MBC and DHA contents and MBC/MBN ratio (data not shown) was observed in January 2010 in comparison with January 2009. Rainfall previous to January 2010 was higher than that previous to January 2009 (Fig. 1). These results could be related to several events, such as differences in soil moisture conditions and changes in the composition of the biomass with less efficiency in immobilization of C as could be indicated by the low MBC/TOC ratio and DHA activity.

The maintenance of a surface cover of residue and soil no-till management, in both conservation practices, produced a stratification of organic carbon and microbial biomass content and enzymatic activities, among the upper and deeper layers of the soil (Doran, 1980; Dalal et al., 1991; Madejón et al., 2007). Such results lead to an improvement in soil quality, particularly in the upper layer, which is of great importance in soil function, since the surface layer is fundamental as it is involved in gas interchange and in water, nutrients, organic matter and biocide distribution in the soil (Mrabet, 2002; Franzluebbers, 2004). Franzluebbers (2002)

points out the importance of TOC stratification ratio (TOC upper layer/TOC deeper layer) as a suitable indicator of soil quality. This author reported that degraded soils never have a ratio >2 . Our results show a ratio (TOC 0–5/TOC 10–25) around 1.7 to conservation tillage (RT and NT) in comparison to 1.5 to TT after harvesting in 2010.

5. Conclusion

Implementation of mouldboard ploughing in plots after 8 years under no-till had a negative outcome on organic carbon fractions and on enzymatic activities related to its turnover, especially in upper layer (0–5 cm depth), in which the benefits accumulated over several year from soil no-till management. Our results showed that in the short-term, traditional tillage produces losses in organic matter and diminishes soil biochemical quality. Therefore, occasional tillage would not be recommended, especially in these types of vulnerable soils (Leptosols). No-till is the most appropriate system in our conditions in order to improve soil quality and avoid erosion risks. If problems with soil compaction appear in the longer term, chiselling might be a suitable soil tillage practice without a direct negative effect on soil quality.

Acknowledgements

Authors want to thank to Commission Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) through project (AGL2005-2423), which allowed this work to be carried out. S. Melero thanks to CSIC for her contract through program “JAE-Doc” and M. Panettieri thanks to CSIC for funding his fellowship through program “JAE-Predoc”.

References

- Acosta-Martínez, V., Mikha, M.M., Vigil, M.F., 2007. Microbial communities and enzyme activities in soils under alternative crop rotations compared to wheat-fallow for the Central Great Plains. *Appl. Soil Ecol.* 37, 41–52.
- Al-Kaisi, M.M., Yin, X.H., Licht, M.A., 2005. Soil carbon and nitrogen changes as influenced by tillage and cropping systems in some Iowa soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 105, 635–647.
- Bastida, F., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C., 2007. The long-term effects of the management of a forest soil on its carbon content, microbial biomass and activity under a semi-arid climate. *Appl. Soil Ecol.* 37, 53–62.
- Baudoin, E., Philippot, L., Cheneby, D., Chapuis-Lardy, L., Fromin, N., Bru, D., Rabury, B., Brauman, A., 2009. Direct seeding mulch-based cropping increases both the activity and the abundance of denitrifier communities in a tropical soil. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1703–1709.
- Beyer, L., Wachendorf, C., Elsner, C., Knabe, R., 1993. Suitability of dehydrogenase activity assay as an index of soil biological activity. *Biol. Fertil. Soil* 16, 52–56.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen in soil: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.* 17, 837–842.
- Brussaard, L., De Ruiter, P.C., Brown, G.G., 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agric. Ecosyst. Environ.* 121, 233–244.
- Cantero-Martínez, C., Angas, P., Lampurlanés, J., 2003. Growth, yield and water productivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) affected by tillage and N fertilization in Mediterranean semiarid, rainfed conditions of Spain. *Field Crops Res.* 84, 341–357.
- Cookson, W.R., Murphy, D.V., Roper, M.M., 2008. Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient. *Soil Biol. Biochem.* 40, 763–777.
- Czyz, E.A., Dexter, A.R., 2008. Soil physical properties under winter wheat grown with different tillage systems at selected locations. *Intern. Agrophys.* 22, 191–200.
- Dalal, R.C., Henderson, P.A., Glasby, J.M., 1991. Organic matter and microbial biomass in a Vertisol after 20 years of zero-tillage. *Soil Biol. Biochem.* 23, 435–441.
- De la Horra, A.M., Conti, M.E., Palma, R.M., 2003. β -Glucosidase and proteases activities as affected by long-term management practices in a Typic Argiudoll soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34, 2395–2404.
- Doran, J.W., 1980. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 765–771.
- Doran, J.W., Smith, M.S., 1987. Organic matter management and utilization of soil and fertilizer nutrients. In: Follet, R.F., et al. (Eds.), *Soil Fertility and Organic Matter As Critical Components of Production Systems*. Soil Science Society of America Special Publication 19, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 53–72.
- Doran, J.W., Elliott, E.T., Paustian, K., 1998. Soil microbial activity, nitrogen cycling, and long-term changes in organic carbon pools as related to fallow tillage management. *Soil Till. Res.* 49, 3–18.
- ECAP (European Conservation Agricultural and Federation), 1999. *Conservation Agriculture in Europe: Environmental, Economic and EU policy perspectives*. ECAF (European Conservation Agricultural and Federation), Brussels, p. 23.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, 601–606.
- Eivazi, F., Bayan, M.R., Schmidt, K., 2003. Selected soil enzyme activities in the historic sanborn field as affected by long-term cropping systems. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34, 2259–2275.
- Eswaran, H., Van Den Berg, E., Reich, P., 1993. Organic carbon in soils of the world. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57, 192–194.
- Franzluebbers, A.J., 2002. Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil Till. Res.* 66, 95–106.
- Franzluebbers, A.J., 2004. Tillage and residue management effects on soil organic matter. In: Magdof, F., Weil, R.R. (Eds.), *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. CRC Press, FL.
- Feng, Y., Motta, A.C., Reeves, D.W., Burmester, C.H., Van Santen, E., Osborne, J.A., 2003. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1693–1703.
- Gregorich, E.G., Wen, G., Voroney, R.P., Kachanoski, R.G., 1990. Calibration of rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 22, 1009–1011.
- Haynes, R.J., Beare, M.H., 1996. Aggregation and organic matter storage in mesothermal, humid soils. In: Carter, M.R., Stewart, B.A. (Eds.), *Advances in Soil Science. Structure and Organic Matter Storage in Agricultural Soils*. CRC Lewis, Boca Raton, pp. 213–262.
- Lal, R., Blum, W.H., Valentine, C., Stewart, B.A., 1998. Methods for assessment of soil degradation. In: *Advances in Soil Science*, Lewis Publishers, Boca Raton, p. 558.
- Lindwall, C.W., Anderson, D.T., 1981. Agronomic evaluations of minimum tillage systems for summerfallow in southern Alberta. *Can. J. Plant. Sci.* 61, 247–253.
- Madejón, E., Moreno, F., Murillo, J.M., Pelegrín, F., 2007. Soil biochemical response to long-term conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil Till. Res.* 94, 346–352.
- Melero, S., López-Garrido, R., Madejón, E., Murillo, J.M., Vanderlinden, K., Ordóñez, R., Moreno, F., 2009a. Long-term effects of conservation tillage on organic fractions in two soils in southwest of Spain. *Agric. Ecosyst. Environ.* 133, 68–74.
- Melero, S., López-Garrido, R., Murillo, J.M., Moreno, F., 2009b. Conservation tillage: short and long term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil Till. Res.* 104, 292–298.
- Moreno, F., Pelegrín, F., Fernández, J.E., Murillo, J.M., 1997. Soil physical properties, water depletion and crop development under traditional and conservation tillage in southern Spain. *Soil Till. Res.* 41, 25–42.
- Mrabet, R., 2002. Stratification of soil aggregation and organic matter under conservation tillage systems in Africa. *Soil Till. Res.* 66, 119–128.
- Muñoz, A., López-Piñero, A., Ramírez, M., 2007. Soil quality attributes of conservation management regimes in a semi-arid region of south western Spain. *Soil Till. Res.* 95, 255–265.
- Pascual, J.A., García, C., Hernández, T., Ayuso, M., 1997. Changes in the microbial activity of an arid soil amended with urban organic wastes. *Biol. Fertil. Soil* 24, 429–434.
- Paustian, K., Collins, H.P., Paul, E.A., 1997. Management controls in soil carbon. In: Paul, E.A., Paustian, K., Elliott, E.T., Cole, C.V. (Eds.), *Soil Organic Matter in Temperate Ecosystems: Long Term Experiments in North America*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 15–49.
- Paustian, K., Six, J., Elliot, E.T., Hunt, H.W., 2000. Management options for reducing CO₂ emissions from agricultural soils. *Biogeochemistry* 48, 147–163.
- Prosser, J.I., 2002. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil* 244, 9–17.
- Roldán, A., Salinas-García, J.R., Alguacil, M.M., Díaz, E., Caravaca, F., 2005. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. *Geoderma* 129, 178–185.
- Ryan, J., De Pauw, E., Gomez, H., Mrabet, R., 2006. Drylands of the Mediterranean zone: biophysical resources and cropping systems. In: Peterson, G.A., Unger, P.W., Payne, W.A. (Eds.), *Dryland Agriculture*. Agronomy Monograph, No. 23, ASA-CSSA-SSSA Book Pub. Committee, Madison, WI.
- Qin, S., He, X., Hu, C., Zhang, Y., Dong, W., 2010. Response of soil chemical and microbial indicators to conservation tillage versus traditional tillage in the North China Plain. *Eur. J. Soil Biol.* 46, 243–247.
- Sarathchandra, S.U., Perrott, K.W., Littler, R.A., 1989. Soil microbial biomass: influence of simulated temperature changes on size, activity and nutrient content. *Soil Biol. Biochem.* 21, 987–993.
- Schlöter, M., Bach, H.J., Metz, S., Sehy, U., Munch, J.C., 2003. Influence of precision farming on the microbial community structure and functions in nitrogen turnover. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98, 295–304.
- Six, J., Feller, C., Denef, K., Ogle, S.M., de Moraes, J.F.L., Albrecht, A., 2002. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils effects of no-tillage. *Agronomie* 22, 755–775.
- Soil Survey and Staff, 2006. In: *Keys to Soil Taxonomy*. 10th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.
- Sparling, G.P., 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Aust. J. Soil Res.* 30, 195–207.

- Steenwerth, K.L., Belina, K.M., 2008. Cover crops and cultivation: impacts on soil N dynamics and microbiological function in a Mediterranean vineyard agroecosystem. *Appl. Soil Ecol.* 40, 370–380.
- Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2008. Biochemical properties of soils under crop rotation. *Appl. Soil Ecol.* 39, 133–143.
- Trevors, J.T., 1984. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.* 16, 673–674.
- Visser, S., Parkinson, D., 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *Am. J. Altern. Agric.* 7, 33–37.
- Walkley, A., Black, J.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29–38.
- Weil, R.R., Islam, K.R., Stine, M.A., Gruver, J.B., Samson-Liebig, S.E., 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: a simplified method for laboratory and field use. *Am. J. Altern. Agric.* 18, 3–17.
- West, T.O., Post, W.M., 2002. Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation: a global data analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 1930–1946.

V.2. MOLDBOARD PLOWING EFFECTS ON SOIL AGGREGATION AND SOIL ORGANIC MATTER QUALITY ASSESSED BY ^{13}C CPMAS NMR AND BIOCHEMICAL ANALYSES.

Resumen

Efectos del arado de vertedera sobre los agregados del suelo y la calidad de la materia orgánica evaluados mediante ^{13}C CPMAS RMN y análisis bioquímicos.

Se evaluó el efecto de dos prácticas de laboreo (arado de vertedera, LT, y arado chisel, LR) sobre el estado de los agregados del suelo de una finca que venía siendo cultivada bajo la modalidad de no-laboreo (NL). El experimento se llevó a cabo en la finca de secano “Las Navas” cuyo suelo se clasifica como Leptic Typic Xerorthent, situada en Jerez de la Frontera (Cádiz, SO España). Se analizaron varias fracciones de carbono orgánico como el carbono orgánico total (COT), el carbono hidrosoluble (CH), el carbono activo (carbono oxidable con permanganato POxC) y el carbono de la biomasa microbiana (CBM), y dos actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo oxidativo de la materia orgánica del suelo (MO): deshidrogenasa (DHA) y β -Glucosidasa (β -glu). Se utilizó la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C en estado sólido por Polarización Cruzada bajo Rotación al Angulo de Giro Mágico (^{13}C CPMAS NMR) para caracterizar la composición de la MO y su estado de degradación. Después de sólo 2 años de la implementación de las dos nuevas prácticas de laboreo, los análisis de la distribución de agregados en el suelo superficial (0-10 cm) mostraron que, a corto plazo, LT favoreció la ruptura de los agregados. Los menores contenidos en COT, POxC y CBM de las parcelas bajo LT, con respecto a las parcelas NL y LR, pusieron de manifiesto un empeoramiento aparente de la calidad del suelo en esas parcelas. Además, los valores de β -glu fueron más bajos en las muestras de LT. Los análisis de ^{13}C CPMAS NMR mostraron que la MO de las fracciones bajo LT presentaron una razón alquil-C/O-alquil-C más elevada que en las correspondientes fracciones bajo NL y LR. Una señal típicamente asignada a residuos de lignina se encontró en los espectros de las fracciones de mayor tamaño de NL, pero no en las fracciones de LT y LR.

A corto plazo, las muestras bajo LR no mostraron la misma tendencia a la pérdida de calidad como la observada en el caso de LT. Por esa razón, la labor de chisel parece ser una opción viable en el caso de que los problemas originados a largo plazo por el NL requiriesen labores esporádicas.



Moldboard plowing effects on soil aggregation and soil organic matter quality assessed by ^{13}C CPMAS NMR and biochemical analyses



M. Panettieri^{a,*}, H. Knicker^a, A.E. Berns^b, J.M. Murillo^a, E. Madejón^a

^a Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, IRNAS-CSIC, P.O. Box 1052, 41080 Sevilla, Spain

^b Institute of Bio- and Geosciences – Agrosphere (IBG-3), Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 October 2012

Received in revised form 22 May 2013

Accepted 28 May 2013

Keywords:

Tillage
Conservation agriculture
Dryland
Microbial activities
Organic matter quality
Mediterranean soil
Organic carbon storage

ABSTRACT

The impact on soil aggregates status of two tillage practices (moldboard plowing, TT, and chisel plowing, RT) applied to a farm previously cultivated under no-tillage (NT) was studied. The experiment was carried out on a Leptic Typic Xerorthent soil at the “Las Navas” dryland experimental farm located in Jerez de la Frontera (Cadiz, SW Spain). Several organic C pools such as total organic carbon (TOC), water soluble carbon (WSC), permanganate oxidizable carbon (POxC), and microbial biomass carbon (MBC) were analyzed, together with two enzymatic activities related to soil organic matter (SOM) oxidation: dehydrogenase activity (DH) and β -glucosidase activity (β -Glu). ^{13}C cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance (^{13}C CPMAS NMR) spectroscopy was used to characterize the composition of the SOM and its degradation status. Two years after the implementation of the new management practices, analysis of the aggregate distribution of the topsoil (0–10 cm) showed that, even after a short term, TT enhanced aggregate disruption. The apparent reduction in soil quality of TT plots was evident from the lower contents of total organic carbon (TOC), permanganate oxidizable carbon (POxC) and microbial biomass carbon (MBC) if compared with RT and NT. Moreover, TT soil showed also a lower β -glucosidase activity. As confirmed by ^{13}C CPMAS NMR, the SOM of the TT fractions revealed higher alkyl C to O-alkyl ratios than their RT and NT counterparts. Also signals commonly referred to lignin structures were absent in the spectra of the TT fractions, but were still present in those of the larger fractions of the NT treatment.

After a short term evaluation, RT samples did not show the same declining trend as observed for the TT treatment. For this reason, chisel plowing seems to offer a viable occasional management option when required during long-term NT.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The development of human civilization has been widely dependent on agricultural innovation. Nowadays, the principal goals for agricultural researches are enhancing crop yields, improving soil quality, and reducing the emission of greenhouse gases. These three aspects are strongly influenced by soil management practices that can alter soil quality and structure.

Moreover, some of the most important parameters in determining soil structure are the micro/macro-aggregates abundance and turnover. Soil aggregation is controlled by different factors such as soil organic matter (SOM), biota, ionic bridging, clay and silt content, and the presence of carbonate and gypsum (Bronick and Lal, 2005; Plaza-Bonilla et al., 2010), which join together soil particles

of different size (Amézqueta, 1999). The macroaggregate formation is impeded by frequent and deep tillage operations that disrupt aggregates and could cause compaction of lower layers of soil (Six et al., 1999; Álvaro-Fuentes et al., 2009). Furthermore, frequent tillage operations are commonly associated with either the physical removal, burial or in some situations burning of crop residues which greatly limit the accumulation of fresh SOM which during early stages represents one of the main factors responsible for aggregate formation (Jastrow, 1996).

In order to prevent soil erosion and carbon loss, the widespread global trend is to avoid deep plowing practices and types of tillage that include a high number of operations combined with soil inversion such as in traditional tillage (TT). Instead, the use of different degrees of conservation tillage (CT) is preferable which do not involve moldboard plowing and consequently leave a high residue amount after harvesting (at least 30% of soil surface covered by crop residues) as described by Gajri et al. (2002).

Many studies have demonstrated an improvement of soil surface quality in fields managed with CT if compared with

* Corresponding author. Tel.: +34 954624711; fax: +34 954624711.

E-mail address: marco.panettieri@csic.es (M. Panettieri).

corresponding TT fields, microbial activity and diversity were enhanced and SOM quantity was augmented (Franzluebbers, 2002; Madejón et al., 2007).

Moreover, CT can improve subsoil structure, due to the higher SOM content left at surface and the minor number of tillage operation required, although it can also produce topsoil compacting in other cases, due to the higher aggregation strength (Hamza and Anderson, 2005). Previous studies demonstrated that the success of CT depends on spatial and weather conditions (Lal et al., 1989; Moreno et al., 1997). In rainfed semi-arid Mediterranean conditions, it is definitely a recommended option. Those soils are characterized by very low organic matter content and a high risk of erosion, therefore the implementation of some kind of CT helps to maintain and to improve soil quality and, consequently, crop yields (López-Garrido et al., 2011).

The parameters that can assess the benefits produced by CT implementation may vary depending on soil characteristics, climate, crop type and time of establishment. Some works have reported that microbial activities and parameters related to soil microbiology are early response indicators assessing soil changes (Nannipieri, 1994; Melero et al., 2008), whereas total organic carbon (TOC) takes more time to show significant augmentations or decreases (Roldán et al., 2005). In order to elucidate the latter as a mean to characterize soil status, the determination of permanganate oxidizable carbon (POxC) was proposed as an easy and fast method (Weil et al., 2003; Culman et al., 2012). The respective studies demonstrated high correlation levels between POxC content and the amounts of several organic C pools.

To go deeper into a structural characterization of SOM and to interpret changes that are induced by the different management practices, several authors have applied ^{13}C cross polarization magic angle spinning (CPMAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Knicker, 2011; Berns et al., 2008). This powerful tool has a very high number of applications in almost all scientific research areas. The fact that most of SOM compounds are poorly soluble turns solid state NMR spectroscopy into a suitable option for their in depth characterization. However, the high heterogeneity and complexity of SOM leads to broad resonance lines with overlapping peaks. Thus, rather than the identification of single compounds, the main aim of ^{13}C CPMAS NMR spectroscopy in soil science is to obtain information about the relative contribution of different C-groups to the total SOM of the sample.

In addition, paramagnetic substances present in soil, especially iron oxides, can lead to signal suppression during a NMR experiment, in particular, if the C/Fe ratio is below 1 (Arshad et al., 1988). Several studies (Gonçalves et al., 2003; Berns and Conte, 2011; Knicker, 2011) were carried out to test and improve quality and quantity of data obtained from a single spectrum. Most of these studies confirmed that if correct acquisition parameters are used and the content of paramagnetics is low, quantitative reliable CPMAS NMR spectra can be obtained (Knicker, 2011). Most agricultural soils contain no or only few graphenic compounds, but high content of paramagnetics can still be a problem that can be circumvented by demineralization. One approach represents the demineralization with hydrofluoric acid (10%) (Gonçalves et al., 2003), which was shown to efficiently remove Fe oxides and, at the same time, increase the organic matter concentration by dissolving parts of the mineral phase. Unfortunately, this can lead to a C loss due to removal of dissolved organic matter originally adsorbed to the mineral phase. Whereas for most topsoils the latter can be neglected, it can be a major concern in subsoil. On the other hand, recent studies applying variable contact time measurements indicated that this loss is not selective (Knicker, 2011). However, such experiments are fairly time consuming and are not feasible for a routine application. Testing if the C/N ratio before and after the HF-treatment remains comparable is more practical (Schmidt et al.,

1997). For most published studies, this approach confirmed the reliability of the demineralization approach.

The largest amount of scientific papers produced on comparisons between CT and TT regards samples collected as bulk soil. Only a few papers discuss the effects on soil aggregates and even less investigate the relationship between SOM and microbial activities in soil aggregate fractions separated by size.

Therefore, the aim of the present work is the analysis of a wide set of data obtained from a short term experiment on a highly erodible farm soil, which was previously cultivated under no tillage (8 years) on which both a type of conservation tillage (chisel) and a highly aggressive moldboard plowing tillage were implemented.

Using only one soil type eliminates a further varying parameter. However extrapolating our data to other soil types may be difficult and speculative, since variation in soil type implies variation in texture, in water holding capacity, etc. all parameters that can contribute to the sequestration of soil organic matter (Sollins et al., 1996). Furthermore, the different tillages compared in this study represent a typical example of practices commonly used. Nevertheless, the alternation of NT with sporadic tillage is normally used to prevent weeds proliferation or topsoil compaction in the Mediterranean area. Even if moldboard plowing has been identified as being responsible for important negative effects on soil quality, it is still used in many farms. Data from the European Conservation Agriculture Federation (ECAAF) reported that in 2008 only 13.1% of arable lands in Spain were under conservation agriculture, whereas the other European countries rarely exceed 20%.

Our hypothesis was that, even over the short term, TT would provoke an extensive negative effect in the quantity and quality of SOM, especially if it is applied to highly vulnerable soils as the one under evaluation. However, other types of less aggressive tillage, such as reduced tillage (RT), could probably be suggested as a solution, if used sporadically, to solve problems derived from a continuous use of no-tillage practice. To test this, we analyzed a wide set of data related to the quality of the soil, combining the analyses of parameters that have a fast response to soil management (water soluble carbon, permanganate oxidizable carbon, microbial biomass carbon, dehydrogenase and β -glucosidase activities) with parameters that have longer response times (TOC). Finally, SOM composition in the aggregate size fractions, as well as its degradation status were revealed by CPMAS ^{13}C NMR spectroscopy.

Note that, for this work, aggregate fractions were separated depending on their sizes, and not depending on their densities.

2. Materials and methods

2.1. Experimental area and sample description

The experiment was carried out at the “Las Navas” dryland experimental farm, located in Jerez de la Frontera (Cadiz, SW Spain) ($36^{\circ} 50' 29.92'' \text{ N}$, $5^{\circ} 55' 11'' \text{ W}$). The soil is a clay loam (333 g kg^{-1} sand, 315 g kg^{-1} silt and 352 g kg^{-1} clay) with a high carbonate content (up to 60%), a pH (H_2O) = 8 and an organic carbon content, at the beginning of the experiment, of 15 g kg^{-1} . Its classification, agreeing with Soil Survey Staff (1999), is Leptic Typic Xerorthent.

The climate conditions of this area are typically Mediterranean, with mild, but rainy winters (599 mm mean rainfall) and very hot, dry summers. During the last 10 years, the mean daily temperature was approximately 17.6°C . The highest temperature was registered in July (41°C) and lowest in January (-4°C).

2.2. Tillage operations

The farm has been managed by Spanish Association of Conservation Agriculture (AEAC.SV) under no-tillage (direct drilling) since

fall 1999. In 2006 a shallow (less than 5 cm deep) disk harrowing was used in the whole farm in order to control excess weed growth. The crop rotation used here included wheat (*Triticum aestivum* L. in 1999 and 2002; *Triticum durum* Desf. in 2001, 2004, 2006 and 2007) and sunflower (*Helianthus annuus* L. in 2000, 2003 and 2005), which is typical in this region.

In October 2008, a part of the farm was divided into 9 plots of ca. 300 m² each with a completely randomized block design and a corridor of 2.5 m between plots. Vetch (*Vicia sativa* L.) and wheat (*T. durum* Desf.) were rotated on an annual basis. The last crop that was cultivated before sampling was wheat, sown in December 2009 and harvested in July 2010. Three of the plots were always cultivated following the original no-tillage management (NT), in the other plots two different tillages were implemented for the first year of this experiment. The first was a type of reduced tillage (RT) and the other was traditional tillage (TT), consisting of deep soil management with a moldboard plough (25 cm depth) followed by a single pass of disk harrowing at surface before seeding. After wheat harvesting on the TT plots in summer 2008 and 2010, the crop residues were removed for commercial use, while the less valuable vetch residues after the 2009 campaign were buried. Within the RT plots, a sensible reduction of the number and depth of operations (only chiseling, 10–15 cm depth) was performed and high amounts of crop residues were left on the soil surface (>30% of surface covered). The NT plot surface was also covered by previous crop residues and no tillage operations were performed. After the first year, large erosion damages appeared in the TT plots and in 2009 both RT and TT plots were thus plowed using a single pass of a cultivator at 10–15 cm depth, avoiding completely the moldboard plowing. Further information is available in Melero et al. (2011).

In NT and RT the pre-emergence herbicide Glyphosate (2 L ha⁻¹) was applied as weed control. For the TT plots the topsoil/subsoil inversion produced by the tillage operation was sufficient to avoid weeds proliferation.

2.3. Sampling

The sampling comprised the surface soil (0–10 cm) and was performed in October 2010, after wheat harvest (July 2010) and before subsequent tillage operations.

About 1.5 kg composite soil samples were obtained from five predefined spots on each plot. Samples derived from plots with the same treatment are considered as replicates.

Aggregate fractionation by dry-sieving was performed as reported by Schutter and Dick (2002). After gentle manual disruption of larger soil clods, the samples were placed between brown papers and dried at 4 °C for several days.

This procedure has a lower impact on the microbial community's physical habitat than wet-sieving, which completely saturates soil pores, and therefore represents the more appropriate option for assessing the influence of the habitat on soil microorganism studies.

In brief, 1 kg of the dried soil was sieved using several steel sieves mounted on a CISA® Sieve Shaker (model Rp.09) and shaken for 8 min at 250 oscillations min⁻¹. Larger soil clods and stones belonging to the >5 mm fraction were discarded. Five aggregate-size fractions were obtained, 2–5 mm, 1–2 mm, 0.5–1 mm, 0.25–0.5 mm and <0.25 mm. Note that all the fractions except the <0.25 mm one fall into the sand-sized particles fraction and that no textural fractionation was carried out. Three replicates for each fraction and treatment were obtained for a total number of 45 samples.

After soil fractionation, each fraction sample was divided into two subsamples and one half was stored at 4 °C for further use for microbial biomass carbon analyses (MBC), β -glucosidase (β -Glu) and dehydrogenase (DH) activities. The other half was air dried and subjected to further characterization of SOM through the

determination of the amount of TOC, WSC, POxC, as well as NMR spectroscopic analysis.

The sand correction factor, used for other types of fractionation processes (Elliott et al., 1991), has not been applied to the obtained results, since no textural differences were found between treatments.

2.4. Chemical analyses

In air-dried subsamples, TOC was measured by dichromate oxidation and titration with ferrous ammonium sulphate (Walkley and Black, 1934) and its water soluble carbon (WSC) was determined in a (1/10) aqueous extract by horizontally shaking at 150 rpm for 1 h. The aqueous extract was centrifuged using a fixed angle rotor in 40 mL tubes at 15,000 rpm for 10 min and measured using a TOC V-CSH Shimadzu analyzer.

The content of POxC was determined by oxidation of 5 g of dry weight soil with 2 mL of 0.2 M KMnO₄ in 1 M CaCl₂ (pH 7.2) and 18 mL of distilled water. After 2 min of shaking, the solution was allowed to settle for 10 min and subsequently diluted (1:100, v:v) with distilled water. Non-reduced Mn⁷⁺ was colorimetrically determined at 550 nm (Weil et al., 2003) with a Perkin Elmer EZ210 spectrophotometer.

2.5. Enzymatic activities

In moist-field subsamples, microbial biomass carbon (MBC) content was assessed by the chloroform fumigation–extraction method modified by Gregorich et al. (1990). Concentration of C in the extract was measured by a TOC-VE Shimadzu analyzer. An extraction efficiency coefficient of 0.38 was used to convert the difference in soluble C between the fumigated and the unfumigated soil to MBC (Vance et al., 1987). Dehydrogenase activity was determined according to Trevors (1984) after soil incubation with iodonitrotetrazolium chloride (INT) and measurement of iodonitrotetrazolium formazan (INTF) absorbance at 490 nm with a Perkin Elmer EZ210 spectrophotometer. β -Glucosidase activity was yielded as indicated by Eivazi and Tabatabai (1988). Results for enzymatic and microbial parameters were based on the oven-dried weight of the soil.

2.6. ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy

Prior to NMR analysis, the soils were demineralized to increase their sensitivity by removing the mineral phase and their paramagnetics. Therefore, of each sample, three dried replicates were mixed to obtain a composite sample, of which 10 g were finely ground, put into lockable polyethylene centrifugation vessels (250 mL) and treated four times with 40 mL HCl (10%) to eliminate most of the calcium carbonate content and to avoid the formation of insoluble calcium fluoride during the subsequent demineralization process. After centrifugation and discarding the supernatant of the last HCl treatment, 40 mL 10% (v:v) HF solution was added. The mixture was shaken in the closed vessels for 2 h, and subsequently centrifuged (10 min 3000 rpm using a fixed angle rotor). The supernatant was removed and discarded very carefully, avoiding any spills or skin contact, which can cause great harm to the operator. After repeating the procedure four times, the sample was washed with distilled water until the pH was higher than 5.

The HF-treated samples were analyzed with a Varian INOVA™ NMR unity operating at 7.05 T (300 MHz on ¹H) and a ¹³C resonance frequency of 75.4 MHz. A wide bore broadband two-channel Apex probe was used. Samples were placed in 6 mm MAS zirconia rotors with custom made boron nitride bottom and top spacers and Vespel® drive tips. The boron nitride spacers restricted

Table 1

Assignments of the peaks in the solid state ^{13}C NMR spectra to typical C groups in geochemical samples (referenced to tetramethylsilane = 0 ppm).

Chemical shift range (ppm)	Assignments
220–160	Carboxyl; carbonyl; amide carbons
160–110	Aryl COR or CNR groups; aryl C–H carbons; guaiacyl C ₂ , C ₆ in lignin; olefinic carbons
110–60	Anomeric carbon of carbohydrates; C ₆ of carbohydrates sugars; carbohydrate-derived structures (C ₂ –C ₅) in hexoses; C ₂ , C ₆ of syringyl units of lignin; C α of some amino acids; higher alcohols
60–45	Methoxyl groups; C α of most amino acids, N-alkyl C
45–0	Methylene groups in aliphatic rings and chains; terminal methyl groups

the samples to the homogeneous region of the coil (Berns and Conte, 2011). The spectra were obtained with the cross polarization technique using a ramped ^1H -pulse during a Hartmann-Hahn contact time of 1.5 ms. The rotor spin rate was set to 8000 ± 1 Hz and spectra were collected by using 2k data points over an acquisition time of 20 ms and a recycle delay of 2s. About 20k scans were accumulated.

The reproducibility of solid-state NMR spectra of soil material depends largely on the obtained signal-to-noise ratio. Baldock and Smernik (2002) estimated that, for spectra of a good quality, a 2% limit of significance between the same resonance ranges of two different samples should be taken into account. Diekow et al. (2005) calculated different limits of significance for each spectral region: differences above 8.3% in the concentration of carbonyl C, 5.0% in aromatic C, 2.2% in O-alkyl C and 4.9% in alkyl C were considered as significant for their study. Other NMR studies on Brazilian soils demonstrated absolute deviations between 1 and 25% for the different chemical shift regions of spectra of samples derived from different sites with the same soil type and comparable soil management (Knicker et al., 2012). Therefore, in order to account for possible variations of the organic matter composition throughout the field, the NMR measurements were performed on composite samples.

Spectra elaboration was conducted by MestReNova version 7 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). All the FIDs were transformed by applying a zero filling and an exponential filter function with a line broadening between 50 and 80 Hz according to the sample under analysis. The baseline correction was done with a multipoint baseline correction. Quantification was performed by dividing the spectra into 5 different chemical shift regions which are assigned to typical C groups (Table 1).

2.7. Statistic

Statistical analyses were carried out using PASW Statistic 17.0 and results were expressed as mean values. Data were analyzed by one-way ANOVA each fraction was separated and tillage systems (TT vs. RT vs. NT) were considered as the independent variables.

Parameters significant differences between treatments were established by Tukey test at $p < 0.05$.

Matrix correlation between different properties was based on Pearson correlation coefficients ($p < 0.01$ and $p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Aggregate size distribution

Aggregate distribution may suffer small variations due to antecedent moisture content of the samples (Le Bissonnais, 1996; Vermang et al., 2009). In this experiment, samples were collected

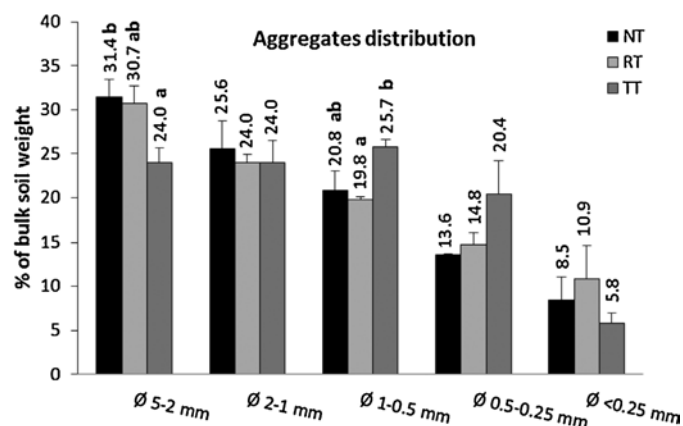


Fig. 1. Aggregate size distribution of sieved topsoils <5 mm from a Leptic Typic Xerorthent soil (dryland experimental farm in Jerez de la Frontera, Cadiz, SW Spain). Significant differences between treatments are indicated with different letter ($p < 0.05$). Vertical bars are standard errors. NT, no tillage; RT, reduced tillage; TT, traditional tillage.

after summer and after a long dry period. Since precipitation was sporadic, the water content of the soil was low. Under these conditions, aggregation induced by water is greatly reduced.

The aggregate distribution in the soils under different management shows some significant differences: a higher content of the 2–5 mm-fraction is found in NT and RT, and a significantly higher content of the fraction with the size 0.5–1 mm is found in TT (Fig. 1). The 2–5 mm fraction should be considered as the “large macroaggregates” fraction; it is the most important one to evaluate the effect of management practices on soil aggregation, because its formation is widely impeded by deep tillage (Jiao et al., 2006). This result agrees with other studies (Six et al., 1999; Jiao et al., 2006; Plaza-Bonilla et al., 2010) that reported that NT and RT generated higher amounts of larger size aggregate fractions (2–5 mm fraction in our case). This suggested that NT and RT are more efficient in preserving soil aggregate structure than the TT management. Our data support the report of Six et al. (1999) who related soil macroaggregate formation and SOM stabilization with tillage operations. According to their suggestions, shallow depth tillage results in slower aggregate turnover and promotes SOM protection within larger size aggregates, in which microaggregates occlude pores present in macroaggregates.

On the other hand, the size of the aggregates is affected by the content of SOM and biological activity (Tisdall and Oades, 1982; Martens et al., 2004) thus, the higher input of crop residues by the NT and RT managements also supports the formation of larger size aggregates. Once macroaggregates are formed, they promote plantlet germination and protect easily erodible soils by impeding the dragging due to wind and water. Those aspects contribute to enhance soil quality and crops yields especially in soil with low organic matter content.

3.2. Total organic carbon

Total Organic Carbon is probably the most used parameter to assess soil quality. Its quantity provides information on the degradation status of soil since soils under forest stands are commonly characterized by higher TOC content if compared with highly exploited agricultural soils.

Previous data obtained for bulk soil (<2 mm) collected in the same area reported TOC contents of 19.3, 20.6, and 14.9 g kg⁻¹ for NT, RT and TT respectively at 0–5 cm depths and 17.5, 16.9, and 15.1 g kg⁻¹ for the same treatments at 5–10 cm depths (Melero et al., 2011).

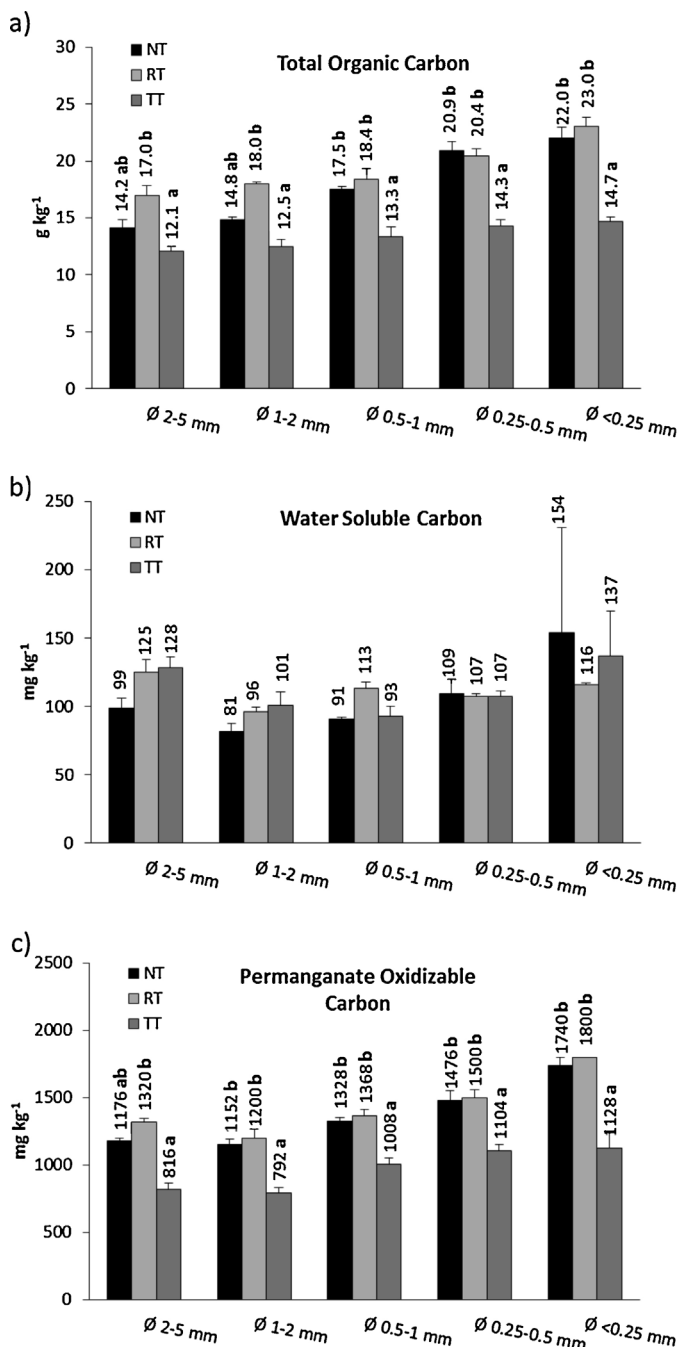


Fig. 2. Mean values of total organic carbon, TOC (a), water soluble carbon, WSC (b) and permanganate oxidizable carbon, POxC (c), in different aggregate-size fractions from the topsoil of an agriculturally used Leptic Typic Xerorthent soil. Significant differences between treatments are indicated with different letter ($p < 0.05$). Vertical bars are standard errors. NT, no tillage; RT, reduced tillage; TT, traditional tillage.

As expected, the TOC values obtained for the fractionated soil and multiplied for relative contribution of each fraction were close to the TOC values obtained for bulk soil samples by Melero et al. (2011).

All fractions of the soils under NT and RT showed significantly higher TOC contents if compared to TT, except for NT 2–5 mm and 1–2 mm fractions (Fig. 2a). This is clear evidence that there is a loss of organic matter in the top 10 cm due to the invasive tillage procedures combined with the removal or burial of crop residues.

Whereas the TOC contents of all TT fractions are in the same range, the TOC contents of the fractions of RT and NT increased with

decreasing size, although the contribution of the fine fraction to the SOM of the soil <5 mm is lower than 11% (Fig. 2a). These results support the findings of Melero et al. (2011), who, for the same plots, reported a significant TOC loss for TT plots in bulk soil (<2 mm), especially at the surface (0–5 cm). For the bulk soil at a 0–10 cm depth, the carbon loss in TT plots, taking NT ones as a reference, was approximately 5 Mg ha^{-1} , whereas RT plots maintained the same level as NT. This trend is even more evident with aggregate size fractionation in our soil (0–10 cm).

Conservation tillage can surely promote carbon sequestration, because crop residues represent additional sources to refill the SOM pool. Concomitantly, the reduced reworking of the soil avoids enhanced carbon mineralization and CO_2 emissions. As a consequence, higher TOC values should be expected in plots under conservation agriculture especially in surface layers. This data was also confirmed for aggregate size fractionated soil (Jiao et al., 2006; Plaza-Bonilla et al., 2010).

3.3. Water soluble carbon

The water soluble carbon fraction is formed by very labile compounds such as carbohydrates and proteins derived from the decomposition of crop residues (Van Ginkel et al., 1994). Most of it represents an easily available source for microbial growth.

In our samples, the carbon concentrations of this pool of all soils were comparable (Fig. 2b), although it showed a high variability for small fractions. Comparing our data to those obtained by Melero et al. (2011) for bulk soil samples, the latter found higher values of WSC for conservation tillages in the same area, immediately after harvesting, where lower values were found when sampling in winter. Significant differences between treatments were detected only in winter samples. This difference can be explained by the fact that we sampled after a dry and hot summer in which, due to the enhanced microbial activity stimulated by higher temperatures, most of the WSC coming from crop residues after harvesting may have been already metabolized. This could also mask the results and hide the differences between treatments.

3.4. Permanganate oxidizable carbon

Several studies proposed another easy and fast method for estimating changes in biologically active soil carbon using potassium permanganate as an oxidizing agent. Weil et al. (2003) optimized the method for field use, and since then several different names have been used for this parameter. Recently, Culman et al. (2012) published a wide review on the correlations between POxC and other C fractions such as particulate organic matter (POM) obtained both by density fractionation and by size fractionation, MBC, WSC and TOC.

In our study, POxC showed a high sensitivity to detect early changes occurring in the soil ecosystem originated by tillage. The RT and NT plots showed significantly higher values for all fractions, except NT in the 2–5 mm fraction, if compared with TT (Fig. 2c). This supports the findings by Culman et al. (2012), who found strong correlations between POxC and size fractionated particulate organic matter. Moreover, Melero et al. (2011) found similar results for bulk soil (<2 mm).

The POxC content augmented with decreasing fraction size, especially for NT and RT, agreeing once more with Culman et al. (2012) that reported a strong relationship between this parameter and smaller size particles of POM.

3.5. Microbial biomass carbon

Several reports have been published on the importance of MBC and its mutual interaction with SOM, in which each of these

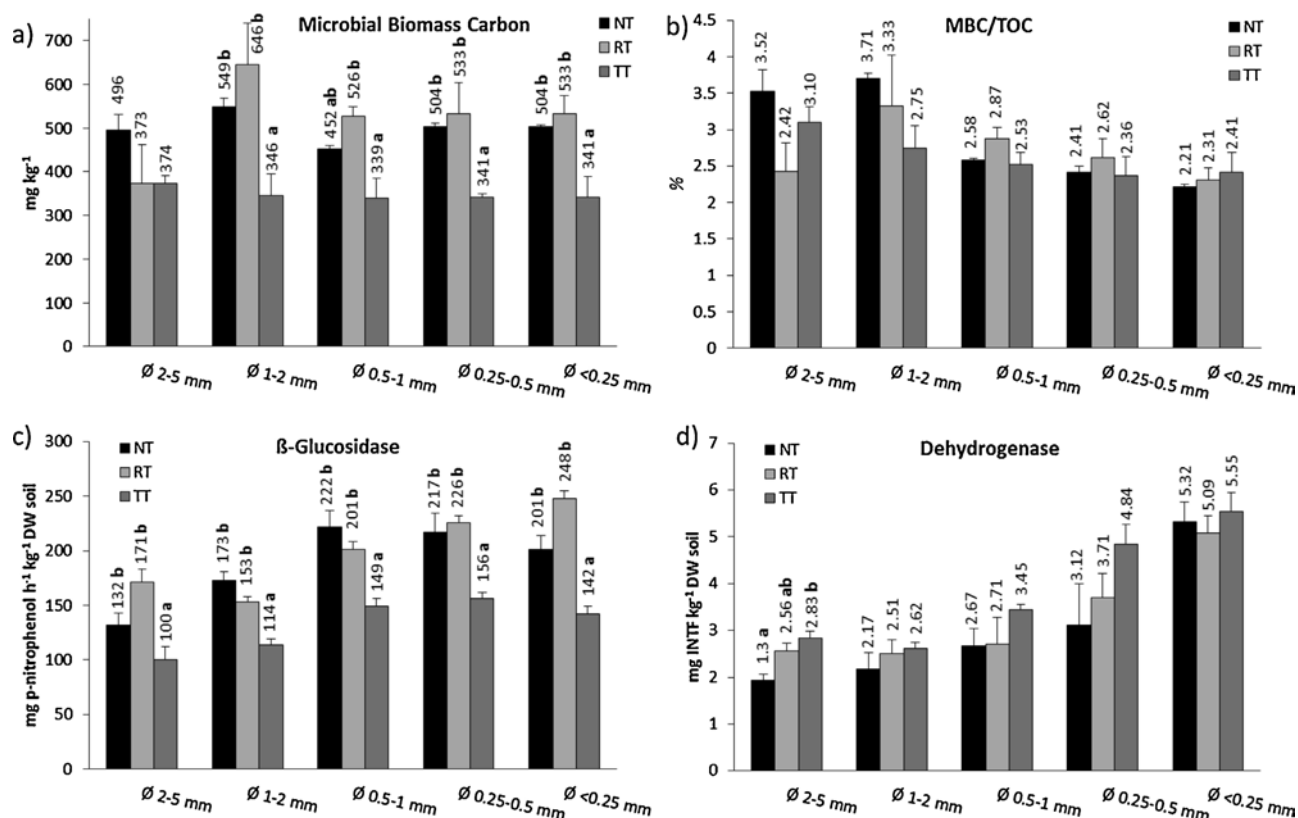


Fig. 3. Mean values of microbial biomass carbon, MBC (a), MBC/TOC ratio (b), β -glucosidase activity, β -Glu (c) and dehydrogenase activity, DH (d), in different aggregate-size fractions of an agriculturally used Leptic Typic Xerorthent soil. Significant differences between treatments are indicated with different letter ($p < 0.05$). Vertical bars are standard errors. NT, no tillage; RT, reduced tillage; TT, traditional tillage.

parameters contribute to enhance and stabilize the other (Franzluibbers et al., 1995).

Soils under TT had lower MBC values for each fraction and, even after the short establishment time of this experiment, differences were significant if compared with conservation treatments (Fig. 3a). For all fractions except for the largest, MBC contents in RT and NT were significantly higher than in TT. Microbial biomass carbon assesses the abundance of microbial communities living in soil. Conservation agriculture enhances and promotes microbial settlement at the surface due to the higher SOM content and the improved physical conditions (Doran, 1980; Eivazi et al., 2003; Madejón et al., 2007).

Determination of MBC in bulk soils at different depths of the plots also showed a negative influence of TT, but differences were not statistically significant after sowing, though some significant differences were found after harvesting (Melero et al., 2011). After size aggregate fractionation, MBC turned into a significant marker of the TT-induced deterioration of the soil.

This result is probably related to the sieving procedure, which could have enhanced the sensitivity of the fumigation/extraction method applied to the different size aggregate fractions. Some of the macroaggregate pores, normally occluded in bulk soil samples, were probably more accessible after soil sieving due to the separation of the different aggregate size fractions.

3.6. MBC/TOC ratio

The MBC/TOC ratio can provide a useful indicator of soil processes. Changes in this ratio reflect alteration of organic matter inputs to these soils, the efficiency of conversion to microbial C, losses of C from the soil, and the stabilization of organic C by the soil mineral fractions (Sparling, 1992).

Values commonly range from 1 to 5%. In our experiment (Fig. 3b), the small fractions showed similar values (from 2.21 to 2.87%) for all treatments. Differences were obtained for the large fractions, in which the absolute MBC/TOC values were higher for all treatments (up to 3.71%) if compared with smaller fractions, implying that in these fractions a larger amount of organic matter is being conserved as MBC. Samples under NT showed higher values for the 1st and 2nd fractions as compared with other treatments, although in the 2nd fraction RT reached a MBC/TOC ratio similar to NT.

3.7. β -Glucosidase activity

As several authors reported (De la Horra et al., 2003; Gil-Sotres et al., 2005), the β -glucosidase activity shows an early response to changes that occur in soil, produced both by anthropogenic practices and by natural events, especially if they altered SOM content. Glucosidases belong to a large class of enzymes directly involved in carbohydrates metabolism. The relationship between higher harvest residue amounts left on the soil surface in conservation tillage and higher β -Glu values has been widely demonstrated (Schutter et al., 2001; Acosta-Martínez et al., 2011).

All TT fractions (Fig. 3c) presented lower values of the activity compared with the corresponding values of conservation tillages (NT and RT). After harvesting, the elevated abundance of fresh plant residues stimulates the synthesis of metabolic patterns that allow the degradation of cellulosic and starch derived structures. The presence of extracellular enzymes such as β -Glu can last for several weeks in soil after this stimulating input, even when lower values for MBC and other activities are found.

Significant differences for this parameter were also found for bulk soil until 10 cm depth during the study carried out by Melero

Table 2Pearson's correlation coefficients (*r*) between the different soil chemical and biological properties.

	WSC	POxC	MBC	MBC/TOC%	DH	B-Glu
TOC	0.228	0.875**	0.538**	−0.395**	0.353**	0.804**
WSC	–	0.217	−0.007	−0.212	0.399	0.098
POxC		–	0.448**	−0.386**	0.360**	0.755**
MBC			–	0.549**	−0.041	0.580**
MBC/TOC%				–	−0.398**	−0.186
DH					–	0.317*

n = 45. TOC, total organic carbon; WSC, water soluble carbon; POxC, permanganate oxidizable carbon; MBC, microbial biomass carbon; MBC/TOC, microbial biomass carbon/total organic carbon ratio; DH, dehydrogenase activity; β-Glu, β-glucosidase activity.

* Correlation is significant at the 0.05 level.

** Correlation is significant at the 0.01 level.

et al. (2011). This trend was well reflected after soil fractionation, since these differences were still significant for all fractions. β-Glu values were higher for medium and small fractions, indicating that a greater amount of fresh-C is present in those fractions.

3.8. Dehydrogenase activity

Dehydrogenase activity is another commonly used indicator of intracellular activity of the microbial community and also an indirect method to assess microbial abundance in soil. Values of this activity tended to increase in small size fractions (Fig. 3d). This fact is related to the degradation status of SOM, in which micro aggregates are easily available for microbial oxidation and this condition stimulates higher production of intracellular enzymes involved in oxidation metabolism, such as DH. In these samples, as confirmed by NMR spectra, the larger fractions contained a higher amount of more stable organic molecules. Smaller fractions were therefore richer in fresh-C substrates for enzymatic oxidation.

In general, no significant differences were observed between treatments, except for the 1st fraction, in which NT was significantly lower than for the other treatments, although the magnitudes of the values were in the same range.

Thus, this parameter seems to be relatively insensitive for those fractions, but significant differences were found for bulk soil at the surface (0–5 cm) by Melero et al. (2011) during a leguminous crop year. However, for the deeper soil layers, differences were not significant. In the present study, the collected soil included material derived from 0 to 10 cm depth and this could have masked potential differences present at the soil surface.

Positive correlations between DH and changes occurring in soil quality were reported by Gil-Sotres et al. (2005). Other authors reported that seasonal changes (Schloter et al., 2003) and different crop roots exudates (Feng et al., 2003) could affect enzymatic activities and eventually hide differences.

3.9. Bivariate correlations

A strong relationship between different parameters was confirmed by Pearson's bivariate correlations (Table 2), in which TOC showed significant ($p < 0.01$) correlations with all the other parameters, except for WSC. Particularly, POxC and β-Glu were the two parameters which showed positive values and the highest *r* taking TOC as a reference. These two parameters were also positively and significantly ($p < 0.01$) correlated to each other. Other parameters had significant ($p < 0.01$) correlation levels to each other, but lower *r* coefficients, such as POxC that showed positive correlations with both DH and MBC, whereas DH had a negative correlation ($p < 0.01$) with MBC/TOC and a positive but less significant correlation ($p < 0.05$) with β-Glu. The wide net of correlations obtained for the present study confirms once more that SOM and biochemical parameters are strongly connected among them, and even slight benefits resulting from CT improved soil quality.

3.10. NMR results

Fig. 4 shows the solid-state ^{13}C NMR spectra of the HF-treated 0.5–1 mm-fraction of the soils under the three different managements. Spectra with a comparable pattern were obtained from the remaining fractions. They are dominated by a strong signal in the chemical shift region between 110 and 60 ppm, assigned to carbohydrates derived mostly from cellulose and bacterial biomass. The high intensity in the alkyl C region (45–0 ppm) and the carboxyl C

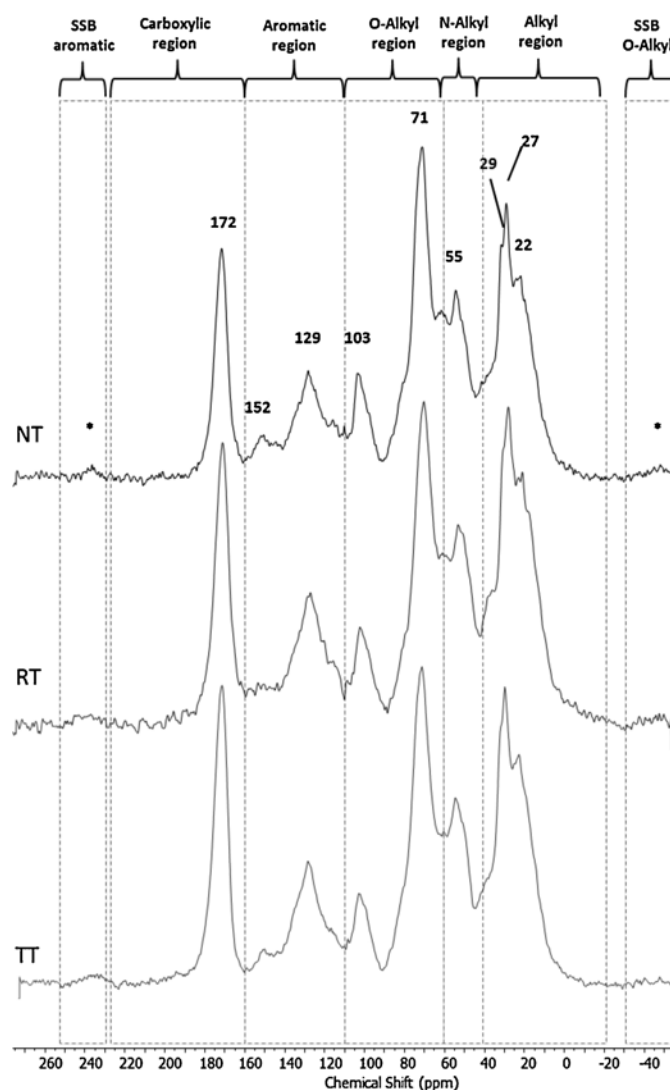


Fig. 4. ^{13}C CPMAS NMR superimposed spectra of the HF-treated 0.5–1 mm-fraction of topsoil material collected from an agriculturally used Leptic Typic Xerothent soil managed with different treatments. (* = 1st and 2nd order spinning side bands). NT, no tillage; RT, reduced tillage; TT, traditional tillage.

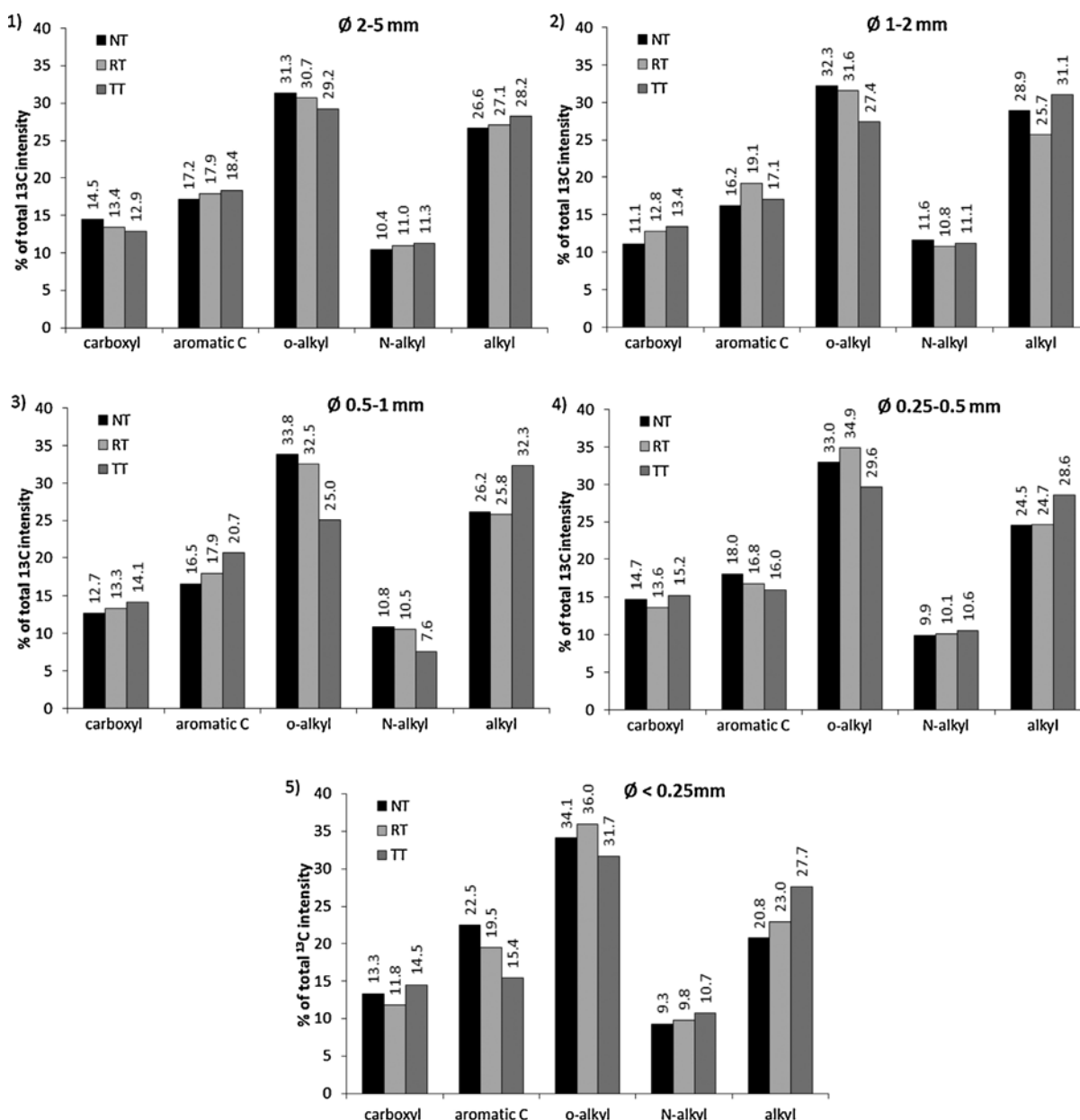


Fig. 5. Relative intensities of the different chemical shift regions given in Table 1 of the ^{13}C NMR spectra obtained from the HF-treated aggregate fractions of the topsoil of an agriculturally used Leptic Typic Xerorthent soil. NT, no tillage; RT, reduced tillage; TT, traditional tillage.

region (220–160 ppm) are in accordance with a higher degradation state of the SOM. The chemical shift region of aryl C (160 to 110 ppm) contains the signal of lignin residues, aromatic amino acids or black carbon. The presence of the first is supported by a signal in the chemical shift region of O-aryl C (160–140 ppm). This signal at 152 ppm is strongest in the spectra acquired from the two largest fractions of the NT soils. This resonance line occurs in the typical chemical shift area of O-aryl C and is commonly assigned to lignin (Lüdemann and Nimz, 1973) or carbon in condensed tannins (Czochanska et al., 1980). Its presence confirms the input of relatively fresh plant residues. In the spectra of the smaller fractions, however, this signal becomes less pronounced and its intensity comparable for all treatments. In accordance with this, some of the intensity between 60 and 45 ppm can be assigned to methoxyl C (55 ppm) of such lignin residues. However, N-alkyl C, as they occur in peptides or amino acids is also contributing to this chemical shift region.

Comparing the spectra of the different fractions, the relative contribution of O-alkyl C tends to increase with decreasing size of the aggregate fractions for soil under NT and RT. However, this trend was not observed in samples coming from TT plots (Fig. 5). This demonstrated that an important part of organic C in the small size fractions in NT and RT treatments was formed by fresh SOM whereas the TT treatment resulted in an accumulation of more oxidized SOM in the same fractions.

The decrease of O-alkyl C commonly occurs concomitantly with an increase in the relative contribution of alkyl C and carboxylic C. The latter is in accordance with a higher oxidation status of organic matter which is expected to result from on-going microbial degradation. Based on this observation, the alkyl C to O-alkyl C ratio was suggested as an index for the degradation or oxidation status of SOM (Baldock and Preston, 1995). However, using this index one has to consider that differences in input material may affect this ratio, thus it should be used only if samples are derived from

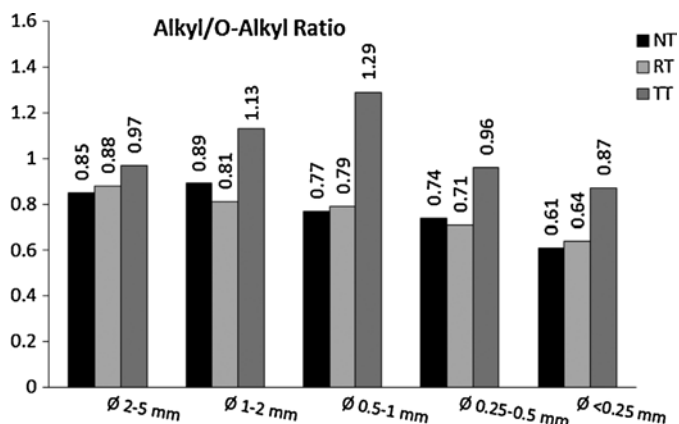


Fig. 6. Alkyl/O-alkyl ratios obtained by means of NMR spectroscopy for each aggregate size fraction of topsoils under different management forms. NT, no tillage; RT, reduced tillage; TT, traditional tillage.

comparable soils with comparable SOM sources. In our experiment, a common trend for all fractions was revealed: NT and RT samples resulted in similar ratio values, while TT samples always show higher ratios, especially for the 2nd, 3rd, and 4th fractions (Fig. 6). The highest value was detected for the fraction 0.5–1 mm of TT.

The intensity in the alkyl C region originates mostly from CH, CH₂ and CH₃ of peptides, lipids, waxes or cutins and suberins, representing more stable structures derived from microbial metabolism and from incomplete degradation of more recalcitrant plant residues (Preston and Trofymow, 2000). Its abundance is higher in highly exploited soil with low residue inputs, in which most of the SOM has already been mineralized and included in cell structures (Kögel-Knabner and Ziegler, 1993; Baldock and Preston, 1995).

On the other hand, in spectra of SOM, the O-alkyl C region is mainly represented by compounds occurring in fresh residues at an early state of decomposition, such as carbohydrates, with a minor contribution of ethers and proteins (Preston and Trofymow, 2000). This region tends to have higher intensities in soil with a great amount of crop residues left on the soil surface (i.e. conservation tillage).

In soils under conservation agriculture, fresh SOM derived from harvest residues left at the surface adds mostly to the intensity of the O-alkyl C region in the respective NMR spectra, therefore they tend to maintain lower alkyl C to O-alkyl C ratios. Furthermore, CT also improves SOM protection against mineralization, by including it in macroaggregates and creating a less oxidative environment around SOM cores, which contributes further to lower alkyl C to O-alkyl C ratios of soil under CT compared with TT ones, as was confirmed in the present experiment. Note that the lowest protection of SOM was observed for the macroaggregates 0.5–1 mm, which are the most abundant in our TT soils.

3.11. General discussion

A global view of the obtained results confirms our hypothesis that the use of TT under Mediterranean conditions reduces soil quality over short time scales.

A significant disruption of larger aggregates was registered for TT plots if compared with NT ones. The lack of SOM protection carried out by larger size aggregates enhanced oxidation process, as confirmed by NMR analyses. This factor, combined with the lower amount of residues left at surface, led to a loss of organic carbon of approximately 5 Mg ha⁻¹ in TT surface soil (0–10 cm) if compared with NT. Nevertheless, RT samples did not show significant differences in the relative abundance of macro-aggregates if compared

to both NT and TT, and no evident carbon losses were registered over the short term.

Solid-state ¹³C NMR analyses demonstrated that tillage practices caused changes also in the characteristics of SOM, not only in its quantity. Higher amounts of O-alkyl C were detected in NT and RT samples if compared with TT, while the opposite trend was registered for alkyl C. While peaks of O-alkyl region are mainly assigned to compounds related to fresh plant residues such as carbohydrates, with a minor contribution of ethers and proteins, peaks in the alkyl C region are assigned to alkylic chains of more stable compounds that could derive from microbial metabolism and/or incomplete degradation of more recalcitrant plant structures (Preston and Trofymow, 2000). The peak at 152 ppm, commonly assigned to lignin (Lüdemann and Nimz, 1973), confirmed the presence of fresher residues in larger fractions of NT. These findings resulted in higher alkyl to O-alkyl ratios, up to 50%, for TT samples that identified a more oxidized status of SOM (Baldock and Preston, 1995), if compared with conservation tillages.

These changes in SOM quantity and quality and the different micro to macro-aggregates ratio altered also other early response factors analyzed. Conservation treatments showed significant higher POxC and MBC contents in both NT and RT if compared with TT, except for 2–5 mm fraction. POxC content was higher in the smaller fractions of conservation tillages, and it followed the same trend as O-alkylic fresh residues. Our findings agreed with Culman et al. (2012) who found a relationship between POxC and smaller size particles of POM.

This study reveals that even the occasional use of moldboard plowing on NT plots provokes rapid depletion of SOM pools and enhances the risk of erosion of the arable layer of highly vulnerable soils at short term (López-Garrido et al., 2011).

4. Conclusion

The present work confirmed that even on a short time scale and in one single application, moldboard plow can radically change soil status, leading to the selective preservation of more degraded soil organic matter. The disruption of macroaggregate, the high degradation status of soil organic matter assessed by solid-state ¹³C NMR together with the reduced input of fresh plant residues left on soil surface dramatically worsened the soil quality in TT samples. This effect was evident, as expected, for parameters that have a fast response to soil management, such as POxC, MBC and β-glu, but also lower values of TOC at surface were observed for TT.

For these reasons, moldboard plowing should be completely avoided, in particular under conditions comparable to those in our study. On the other hand chisel plowing did not produce similar negative short-term effects even when analyzing soil aggregates and no significant deterioration were found for reduced tillage plots. Therefore, chisel may be considered as a viable option in case some type of tillage is sporadically required to solve eventual crop problems. In these cases, TT should be substituted by other types of less aggressive tillage such as chisel plow that did not demonstrate the same worsening effects at short term.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Interministerial Commission of Science and Technology (CICYT) through project AGL2010-22050-C03-03, which allowed this work to be carried out, and the Institute of Bio- and Geosciences-Agrosphere (IBG-3) of Forschungszentrum Jülich GmbH, which hosted the senior author during his grant and provided access to the NMR facility.

M. Panettieri thanks European Social fund (ESR), CSIC, and the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain for funding his Ph.D. grant (JAE-PreDoc) and his stay at the Institute of Bio- and

Geosciences – Agrosphere (IBG-3) of Forschungszentrum Jülich GmbH.

References

- Acosta-Martínez, V., Lascano, R., Calderón, F., Booker, J.D., Zobeck, T.M., Upchurch, D.R., 2011. Dryland cropping systems influence the microbial biomass and enzyme activities in a semiarid sandy soil. *Biol. Fertil. Soils* 47, 655–667.
- Álvarez-Fuentes, J., Cantero-Martínez, C., López, M.V., Paustian, K., Denef, K., Stewart, C.E., Arrúe, J.L., 2009. Soil aggregation and soil organic carbon stabilization: effects of management in semiarid mediterranean agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73, 1519–1529.
- Amézketa, E., 1999. Soil aggregate stability: a review. *J. Sustain. Agricul.* 14, 83–151.
- Arshad, M.A., Schnitzer, M., Preston, C.M., 1988. Characterization of humic acids from termite mounds and surrounding soils, Kenya. *Geoderma* 42, 213–225.
- Baldock, J.A., Preston, C.M., 1995. Chemistry of carbon decomposition processes in forests as revealed by solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. In: Kelly, J.M., McFee, W.W. (Eds.), *Carbon Forms and Functions in Forest Soils*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 89–117.
- Baldock, J.A., Smernik, R.J., 2002. Chemical composition and bioavailability of thermally altered *Pinus resinosa* (Red pine) wood. *Org. Geochem.* 33, 1093–1109.
- Berns, A.E., Conte, P., 2011. Effect of ramp size and sample spinning speed on CPMAS ¹³C NMR spectra of soil organic matter. *Org. Geochem.* 42, 926–935.
- Berns, A.E., Philipp, H., Narres, H.-D., Burauel, P., Vereecken, H., Tappe, W., 2008. Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *Eur. J. Soil Sci.* 59, 540–550.
- Bronick, C.J., Lal, R., 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124, 3–22.
- Culman, S.W., Snapp, S.S., Freeman, M.A., Schipanski, M.E., Beniston, J., Lal, R., Drinkwater, L.E., Franzluebbers, A.J., Glover, J.D., Stuart Grandy, A., Lee, J., Six, J., Maul, J.E., Mirsky, S.B., Spargo, J.T., Wander, M.M., 2012. Permanganate oxidizable carbon reflects a processed soil fraction that is sensitive to management. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76, 494–504.
- Czochanska, Z., Foo, L.Y., Newman, R.H., Porter, L.J., 1980. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2278–2286.
- De la Horra, A.M., Conti, M.E., Palma, R.M., 2003. β -glucosidase and proteases activities as affected by long-term management practices in a typical argiudoll soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34, 2395–2404.
- Diekow, J., Mielniczuk, J., Knicker, H., Bayer, C., Dick, D.P., Kögel-Knabner, I., 2005. Carbon and nitrogen stocks in physical fractions of a subtypical Acrisol as influenced by long-term no-till cropping systems and N fertilisation. *Plant Soil* 268, 319–328.
- Doran, J.W., 1980. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 765–771.
- Elliott, E.T., Palm, C.A., Reuss, D.E., Monz, C.A., 1991. Organic matter contained in soil aggregates from a tropical chronosequence: correction for sand and light fraction. *Agric. Ecosyst. Environ.* 34, 443–451.
- Eivazi, F., Bayan, M.R., Schmidt, K., 2003. Select soil enzyme activities in the historic Sanborn field as affected by long-term cropping systems. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34, 2259–2275.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, 601–606.
- Feng, Y., Motta, A.C., Reeves, D.W., Burmester, C.H., Van Santen, E., Osborne, J.A., 2003. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1693–1703.
- Franzluebbers, A.J., 2002. Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil Tillage Res.* 66, 95–106.
- Franzluebbers, A.J., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 1995. Soil organic carbon, microbial biomass, and mineralizable carbon and nitrogen in sorghum. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, 460–466.
- Gajri, P.R., Arora, V.K., Prihar, S.S., 2002. *Tillage for Sustainable Cropping*. International Book Distributing Co., Lucknow, India.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37, 877–887.
- Gonçalves, C.N., Dalmolin, R.S.D., Dick, D.P., Knicker, H., Klamt, E., Kögel-Knabner, I., 2003. The effect of 10% HF treatment on the resolution of CPMAS ¹³C NMR spectra and on the quality of organic matter in Ferralsols. *Geoderma* 116, 373–392.
- Gregorich, E.G., Wen, G., Voroney, R.P., Kachanoski, R.G., 1990. Calibration of a rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 22, 1009–1011.
- Hamza, M.A., Anderson, W.K., 2005. Soil compaction in cropping systems: a review of the nature, causes and possible solutions. *Soil Tillage Res.* 82, 121–145.
- Jastrow, J.D., 1996. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 28, 665–676.
- Jiao, Y., Whalen, J.K., Hendershot, W.H., 2006. No-tillage and manure applications increase aggregation and improve nutrient retention in a sandy-loam soil. *Geoderma* 134, 24–33.
- Knicker, H., 2011. Solid state CPMAS ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy in organic geochemistry and how spin dynamics can either aggravate or improve spectra interpretation. *Org. Geochem.* 42, 867–890.
- Knicker, H., Nikolova, R., Dick, D.P., Dalmolin, R.S.D., 2012. Alteration of quality and stability of organic matter in grassland soils of Southern Brazil highlands after ceasing biannual burning. *Geoderma* 181–182, 11–21.
- Kögel-Knabner, I., Ziegler, F., 1993. Carbon distribution in different compartments of forest soils. *Geoderma* 56, 515–525.
- Lal, R., Logan, T.J., Fausey, N.R., 1989. Long-term tillage and wheel traffic effects on a poorly drained mollic ochraqualf in northwest Ohio. 2. Infiltrability, surface runoff, sub-surface flow and sediment transport. *Soil Tillage Res.* 14, 359–373.
- Le Bissonnais, Y., 1996. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodibility: I. Theory and methodology. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 425–437.
- López-Garrido, R., Madejón, E., Murillo, J.M., Moreno, F., 2011. Soil quality alteration by mouldboard ploughing in a commercial farm devoted to no-tillage under Mediterranean conditions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 182–190.
- Lüdemann, H.D., Nimz, H., 1973. Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectra of lignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 1162–1169.
- Madejón, E., Moreno, F., Murillo, J.M., Pelegrín, F., 2007. Soil biochemical response to long-term conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil Tillage Res.* 94, 346–352.
- Martens, D.A., Reedy, T.E., Lewis, D.T., 2004. Soil organic carbon content and composition of 130-year crop, pasture and forest land-use managements. *Global Change Biol.* 10, 65–78.
- Melero, S., Panettieri, M., Madejón, E., Macpherson, H.G., Moreno, F., Murillo, J.M., 2011. Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in SW, Spain: effect on soil quality. *Soil Tillage Res.* 112, 107–113.
- Melero, S., Vanderlinden, K., Ruiz, J.C., Madejón, E., 2008. Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 437–442.
- Moreno, F., Pelegrín, F., Fernández, J.E., Murillo, J.M., 1997. Soil physical properties, water depletion and crop development under traditional and conservation tillage in southern Spain. *Soil Tillage Res.* 41, 25–42.
- Nannipieri, P., 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), *Soil Biota. Management in Sustainable Farming System*. CIRSIO, Victoria, Australia, pp. 238–244.
- Plaza-Bonilla, D., Cantero-Martínez, C., Álvarez-Fuentes, J., 2010. Tillage effects on soil aggregation and soil organic carbon profile distribution under Mediterranean semi-arid conditions. *Soil Use Manage.* 26, 465–474.
- Preston, C.M., Trofymow, J.A., 2000. Variability in litter quality and its relationship to litter decay in Canadian forests. *Can. J. Bot.* 78, 1269–1287.
- Roldán, A., Salinas-García, J.R., Alguacil, M.M., Caravaca, F., 2005. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Appl. Soil Ecol.* 30, 11–20.
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98, 255–262.
- Schmidt, M.W.I., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kögel-Knabner, I., 1997. Improvement of ¹³C and ¹⁵N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with 10% hydrofluoric acid. *Eur. J. Soil Sci.* 48, 319–328.
- Schutter, M.E., Sandeno, J.M., Dick, R.P., 2001. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biol. Fert. Soils* 34, 397–410.
- Schutter, M.E., Dick, R.P., 2002. Microbial community profiles and activities among aggregates of winter fallow and cover-cropped soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 142–153.
- Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., 1999. Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-tillage systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1350–1358.
- Soil Survey Staff, 1999. *Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*, 2nd ed. Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 436.
- Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B.A., 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma* 74, 65–105.
- Sparling, G.P., 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Aust. J. Soil Res.* 30, 195–207.
- Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* 33, 141–163.
- Trevors, J.T., 1984. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.* 16, 673–674.
- Van Ginkel, J.H., Merckx, R., van Veen, J.A., 1994. Microbial biomass method based on soluble carbon in the soil solution. *Soil Biol. Biochem.* 26, 417–419.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703–707.
- Vermang, J., Demeyer, V., Cornelis, W.M., Gabriels, D., 2009. Aggregate stability and erosion response to antecedent water content of a loess soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73, 718–726.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29–38.
- Weil, R.R., Islam, K.R., Stine, M.A., Gruver, J.B., Samson-Liebig, S.E., 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: a simplified method for laboratory and field use. *Am. J. Alter. Agric.* 18, 3–17.

V.3. SOIL ORGANIC MATTER DEGRADATION IN AN AGRICULTURAL CHRONOSEQUENCE FARM UNDER DIFFERENT TILLAGES EVALUATED BY ENZYMATIC ACTIVITIES AND ^{13}C CPMAS NMR.

Resumen

Evaluación de la degradación de la materia orgánica en una “cronosecuencia” agrícola de una finca bajo distintos laboreos mediante actividades enzimáticas y ^{13}C CPMAS RMN.

Las operaciones de laboreo interactúan intensamente con las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

Bajo condiciones mediterráneas, la agricultura de conservación (AC) mejora la calidad del suelo en superficie y limita la mineralización de la materia orgánica del suelo (MO). Las actividades enzimáticas, el carbono orgánico total (COT) y las fracciones lábiles de carbono han sido propuestos como índices de la calidad del suelo. El objetivo de este artículo es evaluar las conexiones que existen entre estos parámetros y cómo el laboreo puede afectar a los ciclos de acumulación y degradación de la MO. Para ello, se evaluaron cinco actividades enzimáticas distintas, el COT, el carbono hidrosoluble (CH) y el carbono de la biomasa microbiana (CBM) en muestras de suelo procedentes de una finca experimental situada en el SO de España. Se compararon tres experimentos con distinta antigüedad: 21, 8 y 4 años desde su establecimiento, y tres tipos de laboreos. El estado de degradación de la MO se evaluó mediante análisis de ^{13}C CPMAS RMN en muestras de suelo masivo (“bulk soil”), materia orgánica particulada y ácidos húmicos.

El laboreo de conservación mejoró la calidad del suelo en superficie, donde se encontraron valores más altos de las actividades fosfatasa alcalina y β -glucosidasa por todos los ensayos, mientras que COT, MBC y actividad arylsuphatasa mostraron diferencias significativas solo en los ensayos de medio y largo plazo.

Los análisis de ^{13}C CPMAS RMN demostraron que los laboreos de conservación favorecieron la acumulación de una MO menos degradada y revelaron una elevada

concentración de material peptídico protegido de la mineralización en las muestras de suelo masivo y en los ácidos húmicos.

Este trabajo evidencia la alta fiabilidad del COT de la fosfatasa alcalina y de la β -glucosidasa como índices de calidad del suelo y propone el uso de los análisis de ^{13}C CPMAS NMR de las fracciones de materia orgánica particulada para evaluar los cambios que se originan en el suelo.

Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence farm under different tillages evaluated by enzymatic activities and ^{13}C CPMAS NMR.

M. Panettieri^{1*}, H. Knicker¹, J.M. Murillo¹, E. Madejón¹, and P.G. Hatcher².

(1) Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, IRNAS-CSIC. PoBox 1052, 41080 Sevilla, Spain.

(2) Department of Chemistry and Biochemistry, Physical Sciences Building, Old Dominion University, 4402 Elkhorn Avenue, Norfolk, VA 23529, United States.

* Corresponding author. *Phone*: +34 954624711; *fax*: +34 954624711;

E-mail addresses: marco.panettieri@csic.es

Abstract

Tillage operations widely interact with soil physical, chemical and biological status. Conservation agriculture (CA) improves soil quality at surface under Mediterranean conditions and limits the mineralization of soil organic matter (SOM). Enzymatic activities, total organic carbon and labile carbon pools were proposed as soil quality indexes. The aim of this manuscript is to evaluate how these indexes are connected among each other and how tillage could affect cycles of storage and degradation of SOM. To reach this objective, five different enzymatic activities, total organic carbon (TOC), water soluble carbon and microbial biomass carbon were evaluated on soil samples collected in an experimental farm situated in SW of Spain. Three experiments with three different tillages that were established at different times were compared. SOM degradation status was assessed by ^{13}C CPMAS NMR analyses in bulk soils (BS), their particulate organic matter (POM) and their humic acids (HAc).

Conservation tillages enhanced soil quality at surface, where higher values of APA and β -glucosidase were found for the three experiments, furthermore values of TOC, MBC and ASA were higher for the mid- and long-term experiments.

^{13}C CPMAS NMR analyses demonstrated that conservation tillages led to a preservation of less degraded SOM and revealed a high amount of peptideous material in BS and HAc samples preserved from degradation.

This study evidenced the high reliability of TOC, β -glucosidase and alkaline phosphatase activities as soil quality indexes and proposes the ^{13}C CPMAS NMR analyses of POM fraction as a way to evaluate changes that occur in soil status.

Keywords: Conservation Agriculture - Humic Acids - Particulate Organic Matter – Total Organic Carbon.

1. Introduction.

The environmental benefits of implementing a sustainable agriculture regard, among others, the soil quality maintenance or improvement, the reduction of greenhouse gases, and the optimization of crop yields. The use of deep plowing tools (e.g. moldboard) that produce the soil inversion is commonly defined as “traditional tillage (TT)”. This tillage is a sum of practices that also includes the crop residues removal, burial or burning and it has been widely related with erosion problems and organic carbon losses (Lal 2005).

Several studies suggested the adoption of some type of conservation tillage (CT) in order to keep an ecological balance between economic and environmental targets (Lal et al. 2007; Moreno et al. 1997; Franzluebbers 2004). These tillages do not involve the use of moldboard and strongly reduce the number of tillage operations; in addition, CT leaves at least a 30% of soil surface covered by crop residues after harvesting (Gajri et al. 2002).

The assessment of soil status under different tillage systems has been carried out by using several indicators referred to physical, chemical or biochemical properties of soil (Franzluebbers et al. 1995; Madejón et al. 2007). The quantity of soil organic matter (SOM) and total organic carbon (TOC) and their distribution among the soil profile are the most common indexes used in the experiments of tillages comparison. These parameters do not present rapid responses to changes that occur in soil and they need more time to show significant differences (Roldán et al. 2005). Furthermore, the quantification of SOM or TOC is not giving any information about the degradation status of the SOM and its metabolism. To overcome these limitations, other pools of SOM have been used as soil quality indicators, such as water soluble carbon (WSC) and microbial biomass carbon (Álvaro-Fuentes et al. 2008; Melero et al. 2009) that could quantify the amount of easily available organic matter and the microbial community dimension, respectively. In contrast to TOC content, WSC and MBC values depend widely on meteorological conditions, crop types, and

methodology which could limit their reliability (Melero et al. 2011).

Enzymatic activities represent the most used early-response factors to evaluate soil quality (Nannipieri 1994; Melero et al. 2008). Several aspects of carbon, nitrogen and nutrient cycles are often evaluated by enzymatic essays. Although some enzymatic activities have been reported as trustworthy indexes of soil status, several studies evidenced a strong seasonal and crop-depending variability (Feng et al. 2003).

The use of ^{13}C cross polarization magic angle spinning (CPMAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has been proposed by several authors as a valuable tool to assess the degradation status of SOM (Preston 1996; Knicker et al. 2012; Baldock and Preston 1995; Golchin et al. 1994a), since it allows the characterization of the SOM composition in its solid state without the use of solvent. However, the heterogeneity and complexity of SOM leads to broad resonance lines with overlapping peaks. Thus, rather than the identification of single compounds, the main aim of ^{13}C CPMAS NMR spectroscopy in soil science is to obtain information about the relative contribution of different C groups to the total SOM of the sample.

In order to obtain reliable composite samples, it is important to limit the spatial variability throughout the field (Knicker et al. 2012). Since interaction between paramagnetic compounds and soil organic matter can affect the detectability of the respective carbons, this interference is often avoided by demineralization with HF (Gonçalves et al. 2003; Knicker 2011; Schmidt et al. 1997). This also leads to an increase of the sensitivity of the NMR experiment due to an enrichment of SOM. Other methods of concentrate the organic matter in the samples represent the isolation of humic acids (HAc) and the extraction of particulate organic matter samples (POM) (Kölbl and Kögel-Knabner 2004). Whereas the first is expected to have minor impact on the chemical composition of SOM, HAc and POM have to be seen as specific fractions which only represent a certain part of the total SOM.

Humic acids are defined as an aged fraction of SOM which is soluble in alkaline solutions. Recent studies have demonstrated that the lower turnover of the HAc is not due to an intrinsic recalcitrance of these molecules, but it is more related to (i) their heterogeneity in size and chemistry (ii) association with soil mineral and (iii) physical protection due to the occlusion of SOM in aggregates that impedes the microbial degradation (Marschner et al. 2008; Kleber et al. 2011).

The particulate organic matter of SOM is separated by a density fractionation and is commonly described as a highly reactive portion of SOM. The fraction not associated to any minerals is mostly composed of fresh plant residues that act as easily degraded high-energy organic materials (mostly carbohydrates and amino acids), whereas the occluded part of POM is strictly bond to the clay fraction of the soil and represents a more aged and stabilized fraction of SOM (Golchin et al. 1994b; Jastrow 1996; John et al. 2005).

The aim of this work was to evaluate changes produced by 3 different tillage forms on SOM in soils of a dryland experimental farm located in south-west of Spain by using different soil quality indicators and ^{13}C CPMAS NMR spectroscopy. The novelty of this experiment consists in the evaluation of a chronosequence of 3 different tillage comparison experiments started at 3 different times on the same experimental area; this could provide an assessment on how chemical and biochemical parameters react to tillage practices and how tillage can influence the cycles of storage/degradation of SOM at different times after establishment. The soil of the experimental area is a Xerofluvent (Soil Survey Staff, 1999). Three commonly used chemical and biochemical parameters (TOC, WSC, and MBC) and five enzymatic activities (β -glucosidase, β -glu; dehydrogenase, DHA; alkaline phosphatase, APA; arylsulphatase, ASA; and protease, PRA) were evaluated. A ^{13}C CPMAS NMR analysis was performed on bulk soil samples (BS), HAc, free POM samples (f-POM) and occluded POM samples (o-POM).

This work helps to select the most reliable soil parameters under our conditions and we hypothesized that the deeper characterization of SOM by NMR techniques could be used as a further trustworthy soil quality index.

2. Materials and methods.

2.1. Experimental area and crop rotation.

The present experiment was carried out at the “La Hampa” dryland experimental farm of the “Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC)” ($37^{\circ}17'\text{N}$, $6^{\circ}3'\text{W}$), located 13 km southwest of the city of Seville (Spain).

The soil under evaluation is an Entisol (Xerofluvent, Soil Survey Staff, 1999) with a sandy clay loam texture (240 g kg^{-1} clay, 180 g kg^{-1} silt and 580 g kg^{-1} sand). At a depth of 0-25 cm the soil has a calcareous $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ of 7.8, an Olsen phosphorus content of 18.8 mg kg^{-1} , a content of alkaline-earth carbonates of about 280 g kg^{-1} , and the organic carbon content is approximately of 9 g kg^{-1} .

The climatic conditions are typically Mediterranean with mild rainy winters (496 mm mean annual rainfall) and very hot and dry summers. The mean annual daily temperature at the experimental site is around 19°C , with maximum and minimum mean monthly temperatures of 33.5°C and 5.2°C registered in July and January, respectively.

Since 1991, a wheat (*Triticum aestivum* L.) – sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop rotation was established. Subsequently, in 2005, a fodder pea crop (*Pisum sativum* L.) was included in the rotation.

Wheat receives deep fertilization with 400 kg ha^{-1} of a complex fertilizer ($15\text{N}-15\text{P}_2\text{O}_5-15\text{K}_2\text{O}$) before sowing and a top dressing with 200 kg ha^{-1} urea ($46\%\text{ N}$), whereas sunflower and fodder pea crops were not fertilized. Since 2002, fertilization has been reduced to 100 kg ha^{-1} (fertilizer complex) with no top dressing fertilizer. Weeds are controlled by tillage or by the application of pre-emergence herbicides depending on the tillage treatment. A rate of 2 L ha^{-1} trifluraline (18%) was applied to

the sunflower crop and 4 L ha⁻¹ glyphosate (18%) was applied to the wheat and fodder pea crop.

2.2. Tillage comparison experiments

An area of about 6000 m² of this farm is destined to 3 different experiments of tillage comparisons. Since 1991, an area of about 2500 m² was divided into 6 plots of approximately 300 m² (22 m × 14 m) each in a completely randomized experimental design (3 replicates per treatment). For this trial traditional tillage (TT_L) and reduced tillage (RT_L) were compared. Hereafter, the definition long-term (L) experiment will be referred to this experiment.

During autumn 2004, a different area of about 1500 m² was divided into 6 plots of approximately 200 m² (20 m × 9 m) each following the same completely randomized experimental design (3 replicates per treatment) as for the long-term experiment. In these plots, a no-tillage management (NT_M) is compared to a traditional tillage (TT_M). Hereafter, the definition mid-term experiment (M) will be referred to this trial. Finally, during autumn 2008, a further area of about 2000 m² was divided into 9 plots of approximately 200 m² (20 m × 9 m) each in a completely randomized experimental design (3 replicates per treatment). For this trial, 3 tillage treatments are under comparison: traditional tillage (TT_S), reduced tillage (RT_S) and no-tillage (NT_S). Hereafter, the definition short-term experiment (S) will be referred to this experiment.

2.3. Tillages description

The TT for each experiment consisted of a deep (25–30 cm) moldboard plowing with soil flip (topsoil/subsoil inversion) followed by two cultivator passes to 15–20 cm depth and a disc harrowing to 15 cm depth. The previous crop residues were burned until 2003, when it was forbidden by the local government, even if residues were burned also in 2004 and 2005 in TT plots thanks to a special permission. Actually the residues are buried into the soil due to the action of the moldboard tool.

Within the RT plots for both long and short-term experiments, the number and depth of

tillage operation is sensibly reduced, retaining only chiseling at a depth of 15–20 cm, every other year and a yearly disc harrowing to 5–7 cm depth, and high amounts of crop residues were left on the soil surface. The NT plot surface was also covered by previous crop residues (except for sunflower stalks that were crumbled into small pieces before sowing), no tillage operations were carried out and sowing was performed by direct drilling.

The percentage of the soil surface covered by residue in both the RT and NT treatments was evaluated as described by Plaster (1992) and it was greater than 60%, showing that conservation tillages were established correctly.

2.4. Sampling

For all the experiments, soil samples were taken in early January 2011, right before fodder pea sowing. For each plot, one composite sample (made of 5 different sampling points) was collected for each of the three different depths: 0–5 cm, 5–10 cm and 10–25 cm, for a total amount of 63 samples. The moist field soil was sieved (<2 mm) and divided into two subsamples. One was immediately stored at 4°C in plastic bags loosely tied to ensure sufficient aeration and to prevent moisture loss before assaying for enzymatic activities.

The other subsample was air dried and used for chemical analyses and for NMR samples preparation.

2.5. Chemical analyses

In air-dried subsamples, total organic carbon (TOC) was measured by dichromate oxidation and titration with ferrous ammonium sulphate (Walkley and Black, 1934). Water soluble carbon (WSC) content was determined in a 1:10 (v:v) aqueous extract by horizontally shaking at 150 rpm for 1 h. The aqueous extract was centrifuged using a fixed angle rotor in 40 mL tubes at 15000 rpm for 10 min and measured using a TOC V-CSH Shimadzu analyzer.

2.6. Enzymatic activities

In the moist-field subsamples, microbial biomass carbon (MBC) and 5 different

enzymatic activities were evaluated. The content of MBC was assessed by the chloroform fumigation–extraction method modified by Gregorich et al. (1990). Concentration of C in the extract was measured by a TOC-VE Shimadzu analyzer and an extraction efficiency coefficient of 0.38 was used to convert the difference in soluble C between the fumigated and the unfumigated soil to MBC (Vance et al. 1987).

Dehydrogenase activity (DHA) in soil was determined according to Trevors (1984) by the reduction of 2-*p*-iodo-nitrophenyl-phenyltetrazolium chloride (INT) to iodo-nitrophenyl formazan (INTF) and its absorbance at 490 nm was measured.

β -glucosidase activity (β -glu), alkaline phosphatase activity (APA) y arylsulphatase activity (ASA) were determined with similar mechanisms, as described by Eivazi and Tabatabai (1988), Tabatabai and Bremner (1969) and Tabatabai and Bremner (1970), respectively. Briefly, soil was incubated for 1h with the corresponding substrate: i) *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside for β -glu, ii) *p*-nitrophenyl phosphate disodium for APA, and iii) *p*-nitrophenylsulphate for ASA. The *p*-nitrophenol produced by the hydrolysis of these substrates was measured spectrophotometrically at 400 nm absorbance.

Protease activity (PRA) was measured after incubation of soil with casein and measurement of the absorbance of the extracted tyrosine at 700 nm (Ladd and Butler 1972).

All the spectrophotometrical measurements were carried out on a Perkin Elmer Lambda EZ210 spectrophotometer. Results for enzymatic and microbial parameters were based on the oven-dried weight of the soil.

2.7. Isolation of SOM fractions

Four different sets of samples were prepared for NMR analyses: i) bulk soil (BS), ii) humic acids (HAc), iii) particulate organic matter (POM) both as free and occluded fractions (f-POM and o-POM respectively). Due to the low organic carbon content of deeper layer samples, only superficial samples (0-5 cm depth) were analyzed by NMR. Air dried subsamples were accurately

mixed in order to obtain a composite sample for each treatment and time of establishment, for a total of 7 samples.

In order to increase the NMR sensitivity of the bulk soil samples, they were demineralized allowing the removal of paramagnetics (Gonçalves et al. 2003). Briefly, 10g of soil were finely-ground, put into lockable polyethylene centrifugation vessels (250 mL) and treated four times with 40 ml HCl (10%) to eliminate most of the calcium carbonate content and to avoid the formation of insoluble calcium fluoride during the subsequent demineralization process. After centrifugation and discarding the supernatant of the last HCl treatment, 40 mL 10% (v:v) HF solution was added. The mixture was shaken in the closed vessels for 2 hours, and subsequently centrifuged (10 min 3000 rpm using a fixed angle rotor). The supernatant was removed and discarded very carefully, avoiding any spills or skin contact, which can cause great harm to the operator. After repeating the procedure four times, the sample was washed with distilled water until the pH was above 5.

Humic acids extraction was realized placing 20 g of soil in a 250 mL centrifuge vessel and adding 1M NaOH free of CO₂. The mixture was sonicated for 5 min, and subsequently centrifuged. The supernatant was collected and the extraction was repeated several times until total discoloration of supernatant. The humic acid fraction was isolated by lowering the pH to 1 adding HCl (10%) under N₂ flow and leaving the solution for 8 hours to allow the precipitate to settle down. The latter was separated from the solution by decanting after centrifugation (5 min, 3500 rpm using a fixed angle rotor) and contained the humic acids which are insoluble at low pH. The supernatant containing fulvic fraction and most of the paramagnetic compounds was discarded. Afterwards the isolates were placed into a 10-12 kDa cut-off membrane and dialyzed into milliQ water until the conductivity become constant and lower than 50 $\mu\text{S cm}^{-3}$ (Wander 2004).

The POM samples were obtained by density fractionation of bulk soil. In a wide plastic vessel, 50 g of soil were accurately scattered and slowly submerged by 250 mL of a solution of sodium polytungstate

($\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}$, MW: 2986,12 g mol⁻¹) at a density of 1.8 g cm⁻³. The mixture was gently shaken and allowed to settle down for 24 hours. The floating f-POM was carefully collected, while the o-POM bound to clay fraction was released by sonication (450 J mL⁻¹) and separated from the mineral fraction by centrifugation (10 min 4000 rpm using a fixed angle rotor). In order to eliminate polytungstate residues, both f-POM and o-POM samples were washed with milliQ water until the conductivity was below 5 $\mu\text{S cm}^{-3}$ (Kölbl and Kögel-Knabner 2004). Subsequently, BS, HAc and POM samples were freeze-dried and grinded before analysis.

2.8. Solid-state ¹³C NMR spectroscopy

The samples were analyzed using a ¹³C cross polarization magic angle spinning sequence (CP MAS) with a Bruker AVANCE II 400 spectrometer, operating at a ¹³C frequency of 100.62 MHz and a ¹H frequency of 400.13 MHz. Approximately 50-100 mg of sample was placed into a zirconium oxide rotor with a diameter of 4 mm and Kel-F caps and measured with a Bruker triple resonance during magic spinning at 12 k Hz. Contact time and recycle delay were set to 1.5 ms and 1 s, respectively. About 20k scans were accumulated.

A good signal-to-noise ratio is the main key to provide a good reproducibility of solid-state NMR spectra of soil material. For spectra of a good quality, Baldock and Smernik (2002) assessed that a 2% limit of significance between the same resonance ranges of two different samples should be taken into account. However, Diekow et al. (2005) calculated different limits of significance for each spectral region: differences above 8.3% in the concentration of carbonyl C, 5.0% in aromatic C, 2.2% in O-alkyl C and 4.9% in alkyl C were considered as significant for their study. Other NMR studies performed by Knicker et al. (2012) on Brazilian soils demonstrated absolute deviations between 1 and 25% for the different chemical shift regions of spectra of samples derived from different sites with the same soil type and comparable soil management. Therefore, in order to

account for possible variations of the organic matter composition throughout the field, the NMR measurements were performed on composite samples.

Spectra were elaborated with MestReNova version 8 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). All the FIDs were transformed by applying a zero filling and an exponential filter function with a line broadening between 50 and 100 Hz according to the sample under analysis. A multipoint baseline correction was used. Quantification was performed by dividing the spectra into 5 different chemical shift regions comprising 0 to 45 ppm, 45 to 60 ppm, 60 to 110 ppm, 110 to 160 ppm and 160 to 220 ppm, assigned to alkyl C, methoxyl/N-alkyl C, O-alkyl C, aromatic C and carbonyl/amide C, respectively.

2.9. Statistic

Data normality was tested prior to analysis. Significant differences between treatments originated by tillage in the long and mid-term experiments (RT_L vs. TT_L, and NT_M vs. TT_M) were shown by a Student's t-test at $p < 0.05$. Soils differences for short-term experiment were analyzed by running a univariate analysis of variance (ANOVA) to test whether there was a significant effect of the treatments (tillage) on each one of the studied variables. Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results.

3.1. Chemical analyses.

The conservation tillages increased the superficial TOC content and the increments became higher and significant with progressing time (Table 1). In RT_L, after 20 years of establishment, a significant augmentation of approximately 30% of TOC at surface (0-5 cm) and at 5-10 cm was observed if compared with TT_L (Table 1). In the mid-term experiment, NT_M showed significantly higher TOC contents than TT_M, but only at the surface (0-5 cm) and with lower magnitude than in the long-term comparison. No significant differences in TOC contents were found for the short-term experiment, although NT_S was the most

effective treatment for TOC accumulation at surface, whereas TT showed higher TOC values at deeper layers if compared with conservation treatments.

No significant differences in WSC were observed between the treatments or experiments. A similar pattern of stratification could be identified among the three experiments, in which WSC content

was higher at 0-5 cm and 5-10 cm and lower at deeper layer (Table 1).

Significant differences for MBC were found only for RT_L at 0-5 cm depth if compared with TT_L. For long and mid-term experiments, MBC content was always higher but not at a significant level in the conservation tillage treatments, whereas a clear trend was not recognizable for short-term experiment (Table 1).

Table 1. Mean values of total organic carbon (TOC, g kg⁻¹), water soluble carbon (WSC, mg kg⁻¹), microbial biomass carbon (MBC, mg kg⁻¹), dehydrogenase activity (DHA, mg INTF kg⁻¹ h⁻¹ DW soil), β -glucosidase activity (β -glu, mg p-nitrophenol kg⁻¹ h⁻¹ DW soil), alkaline phosphatase activity (APA, mg p-nitrophenol kg⁻¹ h⁻¹ DW soil), arylsulphatase activity (ASA, mg p-nitrophenol kg⁻¹ h⁻¹ DW soil), and protease activity (PRA, mg tyrosine kg⁻¹ h⁻¹ DW soil) in soil under no tillage (NT), reduce tillage (RT) and traditional tillage (TT) at three depths (0–5, 5–10 and 10–25 cm) for the three experiment of long-, mid-, and short-term. Significant differences between treatments are indicated with an asterisk or different letters ($p < 0.05$).

Time of establishment	Depth	Treatment	TOC	WSC	MBC	DHA	β -glu	APA	ASA	PRA
Long term	0-5 cm	RT	13.9 *	112	580 *	1.25 *	225 *	362 *	36.3 *	129
		TT	10.8	107	474	0.53	101	259	18.9	99
	5-10 cm	RT	13.0 *	119	627	0.89	132 *	246	29.0 *	53
		TT	10.4	100	530	0.61	75	228	16.9	70
	10-25 cm	RT	8.2	94	588	0.32	41	216	18.8	39
		TT	9.4	90	524	0.41	54	208	19.8	60
Mid term	0-5 cm	NT	10.8 *	118	687	1.05	160 *	306 *	33.6 *	126
		TT	8.9	103	670	0.79	81	222	12.1	102
	5-10 cm	NT	9.4	119	719	0.66	137	246	29.0	68
		TT	8.6	111	604	0.61	80	217	27.0	65
	10-25 cm	NT	6.7	90	644	0.44	29	209	23.4	47
		TT	8.1	82	626	0.43	23	146	25.4	54
Short term	0-5 cm	NT	10.1	117	746	1.17	116 b	310 b	55.0	153
		RT	9.0	104	958	1.04	87 ab	191 a	39.4	152
		TT	9.1	128	753	0.71	63 a	260 ab	37.5	107
	5-10 cm	NT	8.5	103	667	0.38 a	38 a	183 a	46.3	105
		RT	8.2	102	881	0.51 ab	55 ab	252 b	43.8	80
		TT	9.0	119	868	0.69 b	76 b	244 ab	42.0	125
	10-25 cm	NT	6.8	92	581	0.44	30 ab	171	50.2 b	51
		RT	6.3	85	740	0.41	14 a	154	38.8 ab	50
		TT	7.1	80	689	0.44	45 b	185	35.3 a	62

3.2. Enzymatic activities

All the activities under evaluation showed significant higher values for the topsoils of RT_L than those of TT_L except for PRA that showed slightly but not significantly higher values than RT_L. Moreover, significant differences for RT_L were found also at 5-10

cm depth for β -glu and ASA. At deeper layer (10-25 cm), all the measured activity values under TT_L were slightly but not significantly higher than for RT_L (Table 1). For the mid-term experiment, NT_M surface soils showed significant differences for β -glu, APA and ASA. At deeper layers (5-10 and 10-25 cm) no significant differences

were found, although higher activity levels were measured for NT_M samples if compared with TT_M. Exceptions were found for ASA and PRA at 10-25 cm (Table 1).

Significant differences for the short-term experiment were sporadically found. At surface layer, NT_S showed higher β -glu values if compared with TT_S and higher APA if compared with RT_S. The values of other enzyme activities were higher for NT_S but not significant compared with the other treatments were found (Table 1).

The RT_S samples had significantly higher APA values at 5-10 cm depth if compared with NT_S that in its turn had higher ASA values than TT_S at 10-25 cm depth.

Generally, a stratification trend can be identified for all the treatments, in which activity levels are higher at surface and diminished with depth, although this trend was less clear for plots under traditional tillage. Significant differences for the enzymatic activities were mainly found at surface, where the activity levels were higher (Table 1).

3.3. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

The superposed ¹³C CPMAS NMR spectra obtained for BS, HAc, o-POM and f-POM shown in Fig. 1 are referred to the samples of RT_L. Spectra with comparable intensity distributions were obtained for the other treatments. The relative intensity distributions among the different chemical shift regions of the spectra are presented as histograms (Fig. 2, 3 and 4).

The dominant signal in the spectra of BS and of both POM fractions, especially for the f-POM, is identified in the region between 60-110 ppm, which is assigned to *O*-alkyl C.

High intensities corresponding to the alkyl C (45 to 0 ppm) and aromatic C (160 to 110 ppm) were detected for o-POM, HAc and BS samples. HAc and, in a minor extent, o-POM showed a clear phenolic C signal (160 to 140 ppm) that typically derives from lignin. A strong signal between 60 and 45 ppm corresponding to *N*-alkyl C and methoxyl C, was found for BS, o-POM and HAc.

Comparing the organic matter composition of the BS samples in relation to the soil management, higher aromatic C concentrations were evidenced for the traditional tillage of long- and mid-term experiment if compared with the correspondent conservation treatments, even if differences were more expressed for the long-term experiment. No major differences are revealed for the *N*-alkyl C and Carboxyl C contents of the long- and mid-term experiments (Figure 2).

The intensity *O*-alkyl C region was higher for NT_M if compared with TT_M, whereas RT_L and TT_L had the same intensities. TT treatments showed a higher intensity of alkyls at mid-term and a lower intensity for the same region in the long-term experiment. For the short-term samples, only few differences were found between treatments. TT_S had the lowest *N*-alkyl and *O*-alkyl intensities and the highest content in aromatic, whereas NT_S showed the highest content of *O*-alkyls and the lowest intensity for the alkylic region.

For HAc samples from the long-term experiment (Figure 3), RT_L showed higher intensities for carboxyl and aromatic C regions if compared with TT_L, whereas the latter had higher intensity for *O*-alkyl C region. No differences were found for *N*-alkylic C regions. For the mid-term experiment, NT_M showed a higher content of alkyls and lower intensities for aromatic and carboxylic C regions, if compared with TT_M. For *O*-alkyls and *N*-alkyls no differences were found. The short-term experiment confirmed the tendencies for alkyls, *N*-alkyls, and aromatic regions found for long- and mid-term experiments, in which NT had higher values of alkyls and RT had the highest intensity for aromatic C, whereas no differences were found for *N*-alkyls region. Despite to the other experiments, NT_S had more carboxylic and RT_S had more *O*-Alkyls at short-term if compared with corresponding TT_S samples. The spectra obtained for f-POM samples showed a clear pattern. Conservation tillages had the highest *O*-alkyl intensities at mid- and long-term if compared with TT, whereas at short time, differences became less noticeable for this region. Alkyl region inverted its pattern with time, since values

obtained were higher for TT at short- and mid-term but not at long-term, were RT_L had higher values than TT_L . Aromatic and carboxylic regions were greater for TT at long- and mid-term but not at short term, where TT_S had the lowest values if compared to NT_S and RT_S . Differences

found for *N*-alkylic region were less evident, except for o-POM at short-term, where NT_S showed a 2% lower intensity than TT_S (Figure 4).

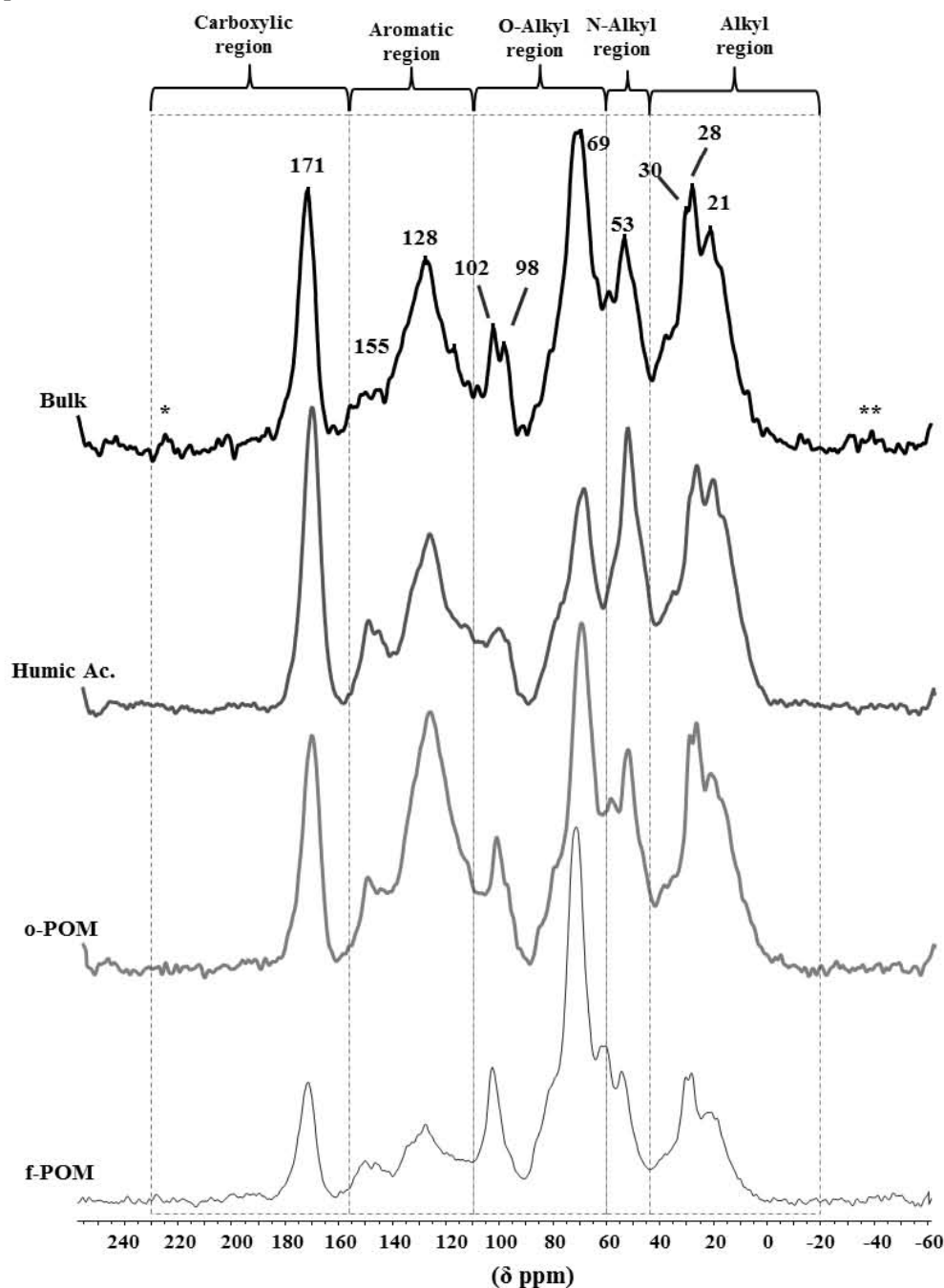


Figure 1. ^{13}C CPMAS NMR superimposed spectra of the topsoil (0-5 cm) collected from the RTL plot of “La Hampa” dryland experimental farm. Bulk: bulk soil demineralized with HF; Humic Ac.: humic acid fraction; o-POM: particulate organic matter-occluded fraction; f-POM: particulate organic matter-free fraction. δ : chemical shift.

*Aromatic C region spinning side bands. **O-Alkyl C region spinning side bands.

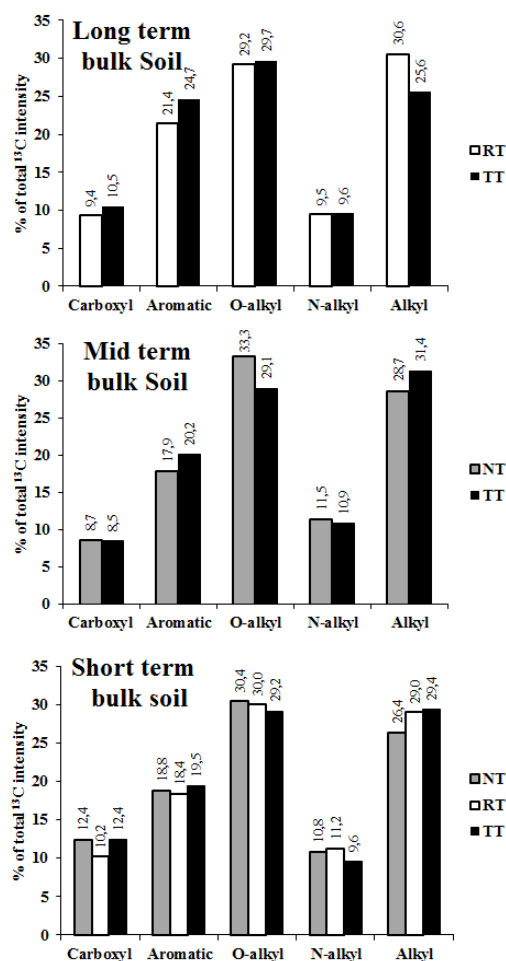


Figure 2. Relative intensities of the different chemical shift regions given in Table 1 of the ^{13}C NMR spectra obtained from the bulk soil (0-5 cm) treated with HF of “La Hampa” dryland experimental farm. The three different times of establishment experiments are compared. NT: no tillage, RT: reduced tillage; TT: traditional tillage.

4. Discussion.

Several studies reported that enzymatic activities are early-response factors and useful indicators in order to evaluate anthropogenic and natural changes that occur in soil (Benedetti and Dilly 2006; Nannipieri 1994; Melero et al. 2008). Due to the characteristics of the soil, enzymatic activities respond in a more reliable way at soil surface, where the micro-environment is richer in oxygen content and organic matter derived from plant residues degradation

(Franzluebbers 2004; Mrabet 2002), as confirmed also by this work.

The enzymes production is widely influenced by several factors, and their evaluation is always depending by the soil characteristics, microbial population, plant residues, roots exudates, and micro- or macro-climatic conditions (Feng et al. 2003; Melero et al. 2011).

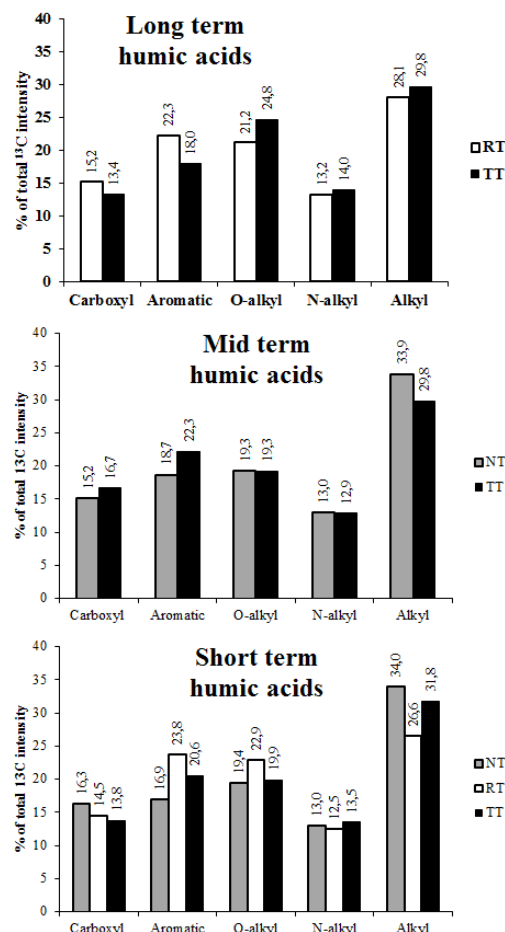


Figure 3. Relative intensities of the different chemical shift regions given in Table 1 of the ^{13}C NMR spectra obtained from the humic acids extracted from the topsoil (0-5 cm) of “La Hampa” dryland experimental farm. The three different times of establishment experiments are compared. NT: no tillage, RT: reduced tillage; TT: traditional tillage.

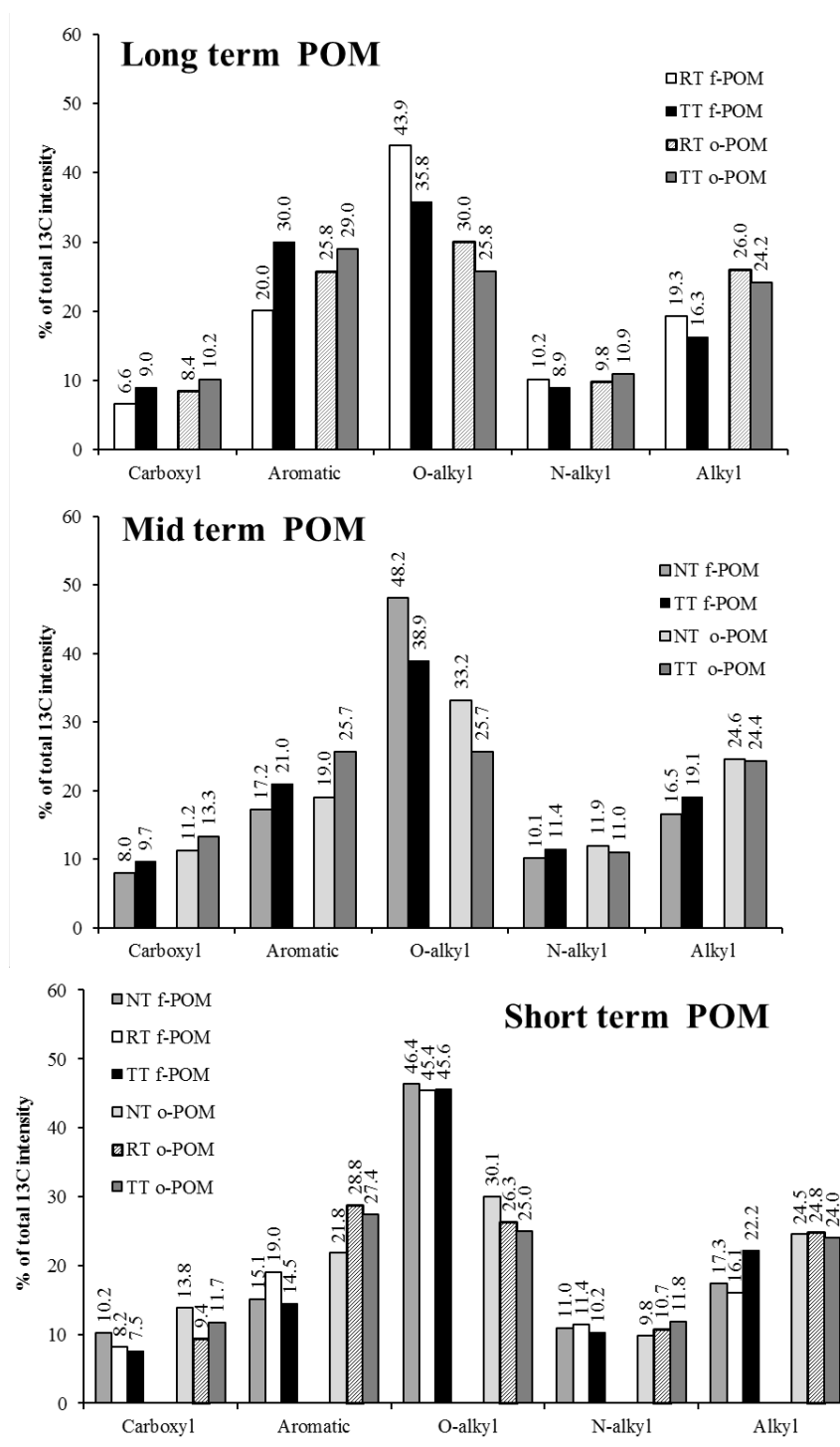


Figure 4. Relative intensities of the different chemical shift regions given in Table 1 of the ^{13}C NMR spectra obtained from the particulate organic matter fractions separated from the topsoil (0-5 cm) of “La Hampa” dryland experimental farm. The three different times of establishment experiments are compared. NT: no tillage, RT: reduced tillage; TT: traditional tillage; f-POM: particulate organic matter-free fraction; o-POM: particulate organic matter-occluded fraction.

In our study, only some of the evaluated activities showed significant differences at surface for all the three experiments. The long-term experiment, showed the biggest

differences between the two tillages under evaluation; RT_L had significantly higher values for enzymatic activities but also for MBC and for TOC at surface. The latter is

considered a parameter that takes more time to give a significant response (Roldán et al. 2005). This result confirms that the use of conservation tillage improves TOC accumulation in the topsoil and promotes a stratification of organic carbon that could highly enhance soil quality (Franzluebbers 2002). As reported by several authors (Álvaro-Fuentes et al. 2008; Six et al. 2000; Franzluebbers 2002), a higher organic carbon content in the topsoil is responsible for a higher level of microbial activity. Furthermore, as time proceeded, some parameters (TOC, β -glu and ASA) showed significant differences also at a depth of 5-10 cm, due to the partial redistribution of surface soil operated by chisel plow in RT_L plots. All the parameters that showed significant differences have already been suggested as possible indicators of soil quality even if in our conditions, β -glu has been suggested as the most reliable one (Madejón et al. 2007; Melero et al. 2011; Panettieri et al. 2013). Comparably in our study, differences with respect to β -glu, were significant for the topsoil both in NT_M and in NT_S if compared with TT_M and TT_S, which reinforces the previous findings.

For the mid-term experiment, TOC values were higher for NT_M samples than for the corresponding TT_M samples. No-tillage provoked an enhancement of TOC at surface even at mid-term, due to the high quantity of residues that covers the plots and the total absence of tillage operation. These factors strongly slow down the degradation of SOM by forming large aggregates that protect SOM from microbial and chemical oxidation.

This effect is also observed in other types of CT, but soils under NT have the highest tendency to form macroaggregates (Plaza-Bonilla et al. 2010; Six et al. 1999).

Activities like APA and ASA maintained their significance at mid-term, and may also be considered as viable soil quality indicators since both activities were described as being strongly related to SOM augmentations (Deng and Tabatabai 1997). The significant differences in APA values for the short term experiment, in which NT_S had significantly higher values than for RT_S, demonstrate that this activity rapidly reflected changes in TOC concentration

even if those changes are not significant, yet. On the contrary, ASA did not show significant difference at short time, due to the high variability of the data. After this results, further analyses on the metabolism of phosphorous and sulfur by ³¹P and ³³S NMR could add important information, even if the latter encounters some major methodological problems if applied to soil samples.

The significantly higher values of DHA and β -glu found at deeper layer for TT_S samples compared with NT_S may be explained by soil inversion produced by moldboard. NT_S maintained constant ASA values at deeper layer whereas other treatments showed a diminishing of this value with depth, which provoked a significantly higher value of ASA for NT_S than for TT_S at 10-25 cm depth.

As reported by Melero et al. (2011) MBC and DHA could be influenced by meteorological fluctuations and external conditions. Significant differences for these parameters were found only for the long term experiment.

Values registered for PRA activity can be related to the strong signal at 53 ppm of the ¹³C CPMAS NMR spectra especially for HAc samples, but also for BS, of all the treatments. This signal is partly derived from N-alkyl C most tentatively of peptides. FT-IR spectroscopy (data not shown) confirmed this assignment by a wide absorption band at 3700-3500 cm⁻¹, typically assigned to the amide N-H stretching vibration (amide A band) and other typical peptidic bands (amide I and II) at ~1650 and ~1540 cm⁻¹ (Krimm and Bandekar 1986). Since NaOH is commonly use also to extract proteins from soil samples, the HAc isolation process could have led to an enrichment of peptides in HAc samples. However, the high peptidic intensity found in bulk soil samples could be related to a high presence of encapsulated or protected peptides that are more recalcitrant to its oxidization. Lignin residues, indicated by the resonance line at 155 ppm, also contributes with their methoxyl C to the intensity of the signal at 56 ppm in the NMR spectra, but the relative low intensity between 160 and 140 ppm confirms a preferential assignment of the

latter to peptideous C (Knicker and Hatcher 1997). Possibly, such peptideous material has been protected by adsorption to minerals (o-POM) or in the humic acid network from a rapid degradation due to PRA activity; Miltner et al. (2012) proposed the entrapment in patchy fragments derived from cell walls as a possible protection mechanism of cytoplasmic material. The PRA values found for this experiment were similar to those found for other studies (Ladd and Butler 1972; Marinari et al. 2006; Trasar-Cepeda et al. 2000).

Chemical and biochemical analyses demonstrated that compared to soils under TT, the implementation of CT progressively improved the quality of superficial soil as time went. Due to these results, the molecular analyses of SOM provide some useful information. The storage and the preservation of SOM in CT, together with a different level of enzymatic activities could lead to a selective enrichment of different classes of organic compounds in soils from the same area under different tillages.

These results indicated that the composition of bulk soil is more similar to the pattern found for HAc than to the one found for POM samples. The five spectral regions contain a certain number of peaks that could be normally assigned to the main class of compounds present in each region (Fig. 1).

The signals in the *O*-alkyl C region (60-110 ppm) are typically assigned to carbohydrates derived mostly from cellulose and bacterial biomass, with a minor contribution of ethers and proteins (Preston and Trofymow 2000). This material is commonly easily metabolized by soil organisms. The fact that the *O*-alkyl C region dominated the spectra of POM samples (Fig. 4) confirms that f-POM is defined as SOM at an early state of decomposition (John et al. 2005; Golchin et al. 1994a).

The aromatic C region embraces intensities of C in lignin residues, aromatic amino acids and black carbon. For the BS samples of our study, the spectra indicate an increase of the aromaticity with progressing time of the experiment, and particularly in TT samples (Fig. 2). This could be related to two different factors that occur in different extent for RT_L and TT_L: i) the continuous agricultural practices of RT leads to fast

degradation of fresh material rich in *O*-alkyl C leading to a relative enrichment of lignin residues and ii) the accumulation of pyrogenic organic matter, since after harvest burning was carried out until 2005 on the TT plots of the long-term experiment and to a smaller also on the plots of mid-term experiments (Knicker 2007; González-Pérez et al. 2004). The short term experiment did not suffer any recent burning event and values of aromatic contents are comparable between the treatments, although one has to consider that fire management had been practiced before establishment of the experiments.

A lower *O*-alkyl C content was revealed for the BS samples of the NT_M than for those of TT_M, indicating that the SOM of the latter was more degraded. The relative contribution of alkylic compounds tends to increase in highly exploited soils with low litter inputs, rich in cellulose (Kögel-Knabner and Ziegler, 1993; Baldock and Preston, 1995). However, for the long term experiment, alkyl region intensity was lower for TT_L than for RT_L, most likely because the input of aromatic structure with the burned residues was higher than the relative preservation of alkyl C in TT_L samples.

Table 2. Alkyl to *O*-Alkyl ratios obtained for the different samples.

Time of establishment	Treatment	Alkyl/ <i>O</i> -Alkyl
Long-Term	RTL	1.05
	TTL	0.86
Mid-Term	NTM	0.86
	TTM	1.08
Short-Term	NTS	0.87
	RTS	0.97
	TTS	1.01

The alkyl C to *O*-alkyl C ratio was suggested as an index for the degradation or oxidation status of SOM (Baldock and Preston, 1995). However, this index is viable only for comparisons between samples from analogous areas and with comparable SOM sources. For the samples of the studied experimental area, the alkyl C to *O*-alkyl C ratio ranged between 0.84 and 1.08 (Table 2). NT_M, NT_S, and TT_L samples

showed the lowest ratios confirming that more fresh litter is entering and accumulating in the soils of the NT treatments under similar conditions (Panettieri et al. 2013). A selective enrichment of black C compounds that are difficultly metabolized by microorganism and that connect intimately with the clay fraction of mineral soil was found for TT_L plots (Marschner et al. 2008). Concomitantly, TT_L showed a lower content in alkyls than the same treatment at short and mid-term. This could be related to the effect of residues burning and to the lower MBC content found in previous year for TT_L if compared to RT_L (Madejón et al. 2009; López-Garrido et al. 2009; Murillo et al. 2004; Madejón et al. 2007). Plaza et al. (2013) have recently pointed out the importance of soil biomass and necromass for the C storage, and a lower amount of “patchy” fragments rich in lipid membranes derived from cell walls could have provoked a depletion of alkyl C content (Miltner et al. 2012).

The better physical quality of soils under NT and the higher SOM quantity resulted in an overall improving of soil quality and in a better preservation of SOM, as demonstrated by enzymatic activities related with SOM degradation, such as β -glu and APA, by the higher TOC contents found in NT samples and by the less degraded SOM present in NT plots.

Humic acids from RT_L and RT_S were richer in carboxyl and aromatic C than corresponding TT plots, probably due to the higher amount of partially decomposed plant residue that could embed a higher quantity of degraded lignin into the humic acids net (Von Lützow et al. 2008). The same pattern for aromatic C was not observed for NT_M and NT_S plots against TT plots, since the absence of tillage could have limited the interaction of fresh plant residues with humic substances and clays. The higher abundance in alkyl C for NT_M and NT_S than for TT plots is mainly due to the higher microbial biomass content that could have enriched the humic acids fraction with necromass residues and cell wall fragments (Miltner et al. 2012). Analyzing the evolution in time of the HAC proceeding from TT plots, a depletion of

alkyl C was observed followed by an enrichment of carboxyl C at mid-term and *O*-alkyl C at long term. This could suggest a possible microbial oxidation pattern of alkanes in absence of an easier metabolizable substrate.

The greater residues quantity left at surface for conservation treatments confers fresh SOM substrate to the soil; this was reflected by the higher abundance of *O*-alkylic in f-POM samples from RT_L and NT_M if compared with TT_L and TT_M, respectively, while differences are less evident for short-term experiment, probably due to the minor time of establishment. Traditional tillages had a greater abundance of aromatic at long- and mid-term, and greater alkylic abundances at short- and mid-term if compared with the correspondent conservation tillages.

As expected, *O*-alkyl C contents of o-POM samples decreased, since o-POM is a more degraded SOM fraction strongly connected to the clay fraction of the soil, probably derived from the roots residues (Golchin et al. 1994a). On the contrary, alkyl and aromatic C regions increased their relative abundances in o-POM compared with f-POM (Plaza et al. 2012).

As for f-POM samples, o-POM samples of RT_L and NT_M had higher intensities for *O*-alkyl C region if compared with correspondent TT treatments and even for the short-term experiment, NT_S and RT_S followed the same pattern if compared with TT_S. The opposite tendency was registered for aromatic C region, which showed higher intensities for TT samples at longer times of establishment. The aromatic compounds could have been derived from the residues burning practices carried on in the long- and mid-term experiment, and once more, the evidences of burning events are confirmed by the NMR spectra (Knicker 2007; González-Pérez et al. 2004). Following the chronosequence for both POM fractions, it seems to rapidly respond to changes in soil management, especially its *O*-alkylic C region, suggesting the analyses of this fraction as a viable indicator of soil quality.

5. Conclusion

This experiment confirmed the viability of some enzymatic activities such as β -glu, APA and in a minor extent ASA, as early indicators of soil quality at surface, whereas some others showed a elevate variability. Some fractions of SOM, such as TOC and MBC needed more time to respond to changes in soil management.

Evidences of burning events were found in BS and POM samples of TT plots especially for the long term experiment, with an accumulation of aromatic structures. The high amount of proteinaceous material indicates a wide protection of the peptides in BS, HAc, and o-POM fractions.

Conservation tillages confirmed once more their positive effect on surface soil quality; enzymatic activity level, TOC, MBC were improved at long-term, and lower alkyl to *O*-alkyl C ratio were found at mid- and short-term for bulk soil, evidencing higher inputs of fresh SOM. Moreover, the results obtained for ^{13}C CPMAS NMR suggested o-POM and f-POM as the most relevant soil fractions in order to evaluate the degradation status of soil under different tillages.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Interministerial Commission of Science and Technology (CICYT) through project AGL2010-22050-C03-03, which allowed this work to be carried out, and the Department of Chemistry and Biochemistry of the Old Dominion University (Norfolk, VA, USA) which hosted the senior author during his grant and provided access to the NMR facility of the College of Science Major Instrumentation Cluster (COSMIC). Dr. Rosa López-Garrido is acknowledged for her technical support.

M. Panettieri thanks European Social fund (ESR), CSIC, and the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain for funding his Ph.D. grant (JAE-PreDoc) and his stay at the Department of Chemistry and Biochemistry of the Old Dominion University (Norfolk, VA, USA).

References

- Álvaro-Fuentes J, López MV, Cantero-Martínez C, Arrúe JL (2008) Tillage effects on soil organic carbon fractions in Mediterranean dryland agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal* 72 (2):541-547
- Baldock JA, Preston CM (1995) Chemistry of carbon decomposition processes in forests as revealed by solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. In: Kelly JM, McFee WW (eds) *Carbon forms and functions in forest soils*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp 89-117
- Baldock JA, Smernik RJ (2002) Chemical composition and bioavailability of thermally altered *Pinus resinosa* (Red pine) wood. *Organic Geochemistry* 33 (9):1093-1109
- Benedetti A, Dilly O (2006) Introduction to approaches to defining, monitoring, evaluating and managing soil quality. In: Bloem J, Hopkins, D. A. B. (ed) *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI, Wallington, pp 3-14
- Deng SP, Tabatabai MA (1997) Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biology and Fertility of Soils* 24 (2):141-146
- Diekow J, Mielniczuk J, Knicker H, Bayer C, Dick DP, Kögel-Knabner I (2005) Carbon and nitrogen stocks in physical fractions of a subtropical Acrisol as influenced by long-term no-till cropping systems and N fertilisation. *Plant and Soil* 268 (1):319-328
- Eivazi F, Tabatabai MA (1988) Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20 (5):601-606
- Feng Y, Motta AC, Reeves DW, Burmester CH, Van Santen E, Osborne JA (2003) Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry* 35 (12):1693-1703
- Franzuebbers AJ (2002) Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil and Tillage Research* 66 (2):95-106

- Franzluebbers AJ (2004) Tillage and Residue Management Effects on Soil Organic Matter. In: Magdoff F, Weil RR (eds) *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. Advances in Agroecology. CRC Press, Boca Raton, pp 227-268.
- Franzluebbers AJ, Zuberer DA, Hons FM (1995) Comparison of microbiological methods for evaluating quality and fertility of soil. *Biology and Fertility of Soils* 19 (2-3):135-140
- Gajri PR, Arora VK, Prihar SS (2002) *Tillage for sustainable cropping*. International Book Distributing co, Lucknow, India
- Golchin A, Oades J, Skjemstad J, Clarke P (1994a) Study of free and occluded particulate organic matter in soils by solid state ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy and scanning electron microscopy. *Soil Research* 32 (2):285-309.
- Golchin A, Oades JM, Skjemstad JO, Clarke P (1994b) Soil structure and carbon cycling. *Australian Journal of Soil Research* 32 (5):1043-1068
- Gonçalves CN, Dalmolin RSD, Dick DP, Knicker H, Klamt E, Kögel-Knabner I (2003) The effect of 10% HF treatment on the resolution of CP/MAS ^{13}C NMR spectra and on the quality of organic matter in Ferralsols. *Geoderma* 116 (3-4):373-392
- González-Pérez JA, González-Vila FJ, Almendros G, Knicker H (2004) The effect of fire on soil organic matter - A review. *Environment International* 30 (6):855-870
- Gregorich EG, Wen G, Voroney RP, Kachanoski RG (1990) Calibration of a rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 22 (7):1009-1011
- Jastrow JD (1996) Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (4-5):665-676
- John B, Yamashita T, Ludwig B, Flessa H (2005) Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils under different types of land use. *Geoderma* 128 (1-2):63-79
- Kleber M, Nico PS, Plante A, Filley T, Kramer M, Swanston C, Sollins P (2011) Old and stable soil organic matter is not necessarily chemically recalcitrant: Implications for modeling concepts and temperature sensitivity. *Global Change Biology* 17 (2):1097-1107
- Knicker H (2007) How does fire affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon? A review. *Biogeochemistry* 85 (1):91-118
- Knicker H (2011) Solid state CP/MAS ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy in organic geochemistry and how spin dynamics can either aggravate or improve spectra interpretation. *Organic Geochemistry* 42 (8):867-890
- Knicker H, Hatcher PG (1997) Survival of protein in an organic-rich sediment: Possible protection by encapsulation in organic matter. *Naturwissenschaften* 84 (6):231-234
- Knicker H, Nikolova R, Dick DP, Dalmolin RSD (2012) Alteration of quality and stability of organic matter in grassland soils of Southern Brazil highlands after ceasing biannual burning. *Geoderma* 181-182:11-21
- Köbl A, Kögel-Knabner I (2004) Content and composition of free and occluded particulate organic matter in a differently textured arable Cambisol as revealed by solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167 (1):45-53
- Krimm S, Bandekar J (1986) *Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins*. vol 38.
- Ladd JN, Butler JHA (1972) Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 4 (1):19-30
- Lal R (2005) Soil erosion and carbon dynamics. *Soil and Tillage Research* 81 (2):137-142
- Lal R, Reicosky DC, Hanson JD (2007) Evolution of the plow over 10,000 years and the rationale for no-till farming. *Soil and Tillage Research* 93 (1):1-12
- López-Garrido R, Díaz-Espejo A, Madejón E, Murillo JM, Moreno F (2009) Carbon losses by tillage under semi-arid

- Mediterranean rainfed agriculture (SW Spain). *Pérdidas de carbono debidas a laboreo bajo agricultura mediterránea de secano* (SE España) 7 (3):706-716
- Madejón E, Moreno F, Murillo JM, Pelegrín F (2007) Soil biochemical response to long-term conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 94 (2):346-352
- Madejón E, Murillo JM, Moreno F, López MV, Arrue JL, Alvaro-Fuentes J, Cantero C (2009) Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil and Tillage Research* 105 (1):55-62
- Marinari S, Mancinelli R, Campiglia E, Grego S (2006) Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecological Indicators* 6 (4):701-711
- Marschner B, Brodowski S, Dreves A, Gleixner G, Gude A, Grootes PM, Hamer U, Heim A, Jandl G, Ji R, Kaiser K, Kalbitz K, Kramer C, Leinweber P, Rethemeyer J, Schäffer A, Schmidt MWI, Schwark L, Wiesenberger GLB (2008) How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171 (1):91-110
- Melero S, López-Garrido R, Murillo JM, Moreno F (2009) Conservation tillage: Short- and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 104 (2):292-298
- Melero S, Panettieri M, Madejón E, Macpherson HG, Moreno F, Murillo JM (2011) Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in SW, Spain: Effect on soil quality. *Soil and Tillage Research* 112 (2):107-113
- Melero S, Vanderlinden K, Ruiz JC, Madejón E (2008) Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *European Journal of Soil Biology* 44 (4):437-442
- Miltner A, Bombach P, Schmidt-Brücken B, Kästner M (2012) SOM genesis: Microbial biomass as a significant source. *Biogeochemistry* 111 (1-3):41-55
- Moreno F, Pelegrín F, Fernández JE, Murillo JM (1997) Soil physical properties, water depletion and crop development under traditional and conservation tillage in southern Spain. *Soil and Tillage Research* 41 (1-2):25-42
- Mrabet R (2002) Stratification of soil aggregation and organic matter under conservation tillage systems in Africa. *Soil and Tillage Research* 66 (2):119-128
- Murillo JM, Moreno F, Girón IF, Oblitas MI (2004) Conservation tillage: long term effect on soil and crops under rainfed conditions in south-west Spain (western Andalusia). *J Agric Res* 2:35-43
- Nannipieri P (1994) The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. Cirsio Publication, Australia, pp 238-244
- Panettieri M, Knicker H, Berns AE, Murillo JM, Madejón E (2013) Moldboard plowing effects on soil aggregation and soil organic matter quality assessed by ¹³C CPMAS NMR and biochemical analyses. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 177 (0):48-57.
- Plaster EJ (1992) *Soil Science and Management*. Delmar Publishers Inc New York:514
- Plaza-Bonilla D, Cantero-Martínez C, Álvaro-Fuentes J (2010) Tillage effects on soil aggregation and soil organic carbon profile distribution under Mediterranean semi-arid conditions. *Soil Use and Management* 26 (4):465-474
- Plaza C, Courtier-Murias D, Fernández JM, Polo A, Simpson AJ (2013) Physical, chemical, and biochemical mechanisms of soil organic matter stabilization under conservation tillage systems: A central role for microbes and microbial by-products in C sequestration. *Soil Biology and Biochemistry* 57:124-134
- Plaza C, Fernández JM, Pereira EIP, Polo A (2012) A comprehensive method for fractionating soil organic matter not protected and protected from decomposition by physical and chemical

- mechanisms. *Clean - Soil, Air, Water* 40 (2):134-139
- Preston CM (1996) Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects. *Soil Science* 161 (3):144-166
- Preston CM, Trofymow JA (2000) Variability in litter quality and its relationship to litter decay in Canadian forests. *Canadian Journal of Botany* 78 (10):1269-1287
- Roldán A, Salinas-García JR, Alguacil MM, Caravaca F (2005) Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Applied Soil Ecology* 30 (1):11-20
- Schmidt MWI, Knicker H, Hatcher PG, Kögel-Knabner I (1997) Improvement of ¹³C and ¹⁵N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with 10% hydrofluoric acid. *European Journal of Soil Science* 48 (2):319-328
- Six J, Elliott ET, Paustian K (1999) Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-tillage systems. *Soil Science Society of America Journal* 63 (5):1350-1358
- Six J, Paustian K, Elliott ET, Combrink C (2000) Soil structure and organic matter: I. Distribution of aggregate-size classes and aggregate-associated carbon. *Soil Science Society of America Journal* 64 (2):681-689
- Soil Survey S (1999) Soil taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. USDA-SCS. . *Agri Handbook* 436
- Tabatabai MA, Bremner JM (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1 (4):301-307
- Tabatabai MA, Bremner JM (1970) Arylsulfatase Activity of Soils I. *Soil Science Society of America Journal* 34 (2):225-229.
- Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S, Gil-Sotres F (2000) Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32 (13):1867-1875
- Trevors JT (1984) Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry* 16 (6):673-674
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19 (6):703-707
- Von Lützow M, Kögel-Knabner I, Ludwig B, Matzner E, Flessa H, Ekschmitt K, Guggenberger G, Marschner B, Kalbitz K (2008) Stabilization mechanisms of organic matter in four temperate soils: Development and application of a conceptual model. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171 (1):111-124
- Wander MM (2004) Soil Organic Matter Fractions and Their Relevance to Soil Quality. In: Weil RR, Magdoff F (eds) *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. CRC Press, Boca Raton (FL), pp 86-130.

V.4. GLYPHOSATE EFFECT ON SOIL BIOCHEMICAL PROPERTIES UNDER CONSERVATION TILLAGE.

Resumen

Efectos del Glifosato sobre las propiedades bioquímicas del suelo bajo laboreo de conservación.

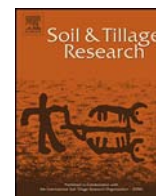
En el laboreo de conservación (LC) se requiere frecuentemente el uso de herbicidas. El glifosato ($C_3H_8NO_5P$, *N*-fosfonometilglicina) es uno de los herbicidas más utilizados. Dado que los parámetros bioquímicos se utilizan frecuentemente como indicadores de la calidad del suelo, la estimulación de esos indicadores producida por el LC puede ser mal interpretada debido a la necesaria aplicación de herbicida. El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto del glifosato sobre los parámetros bioquímicos del suelo y cuánto tiempo pueden perdurar esos efectos en un Entisol franco-areno-arcilloso bajo distintos sistemas de laboreo en el SO de España.

Se llevaron a cabo dos experimentos: i) Uno realizado en condiciones controladas de temperatura, humedad e irradiación en microcosmos de suelos de parcelas bajo no-laboreo (NL) y laboreo reducido (LR) en presencia o en ausencia de glifosato, después de la siembra de girasol (*Helianthus annuus* L.); ii) Otro en el que las muestras se recogieron directamente en una finca experimental después de la siembra del cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.); Se tomaron muestras de suelo LR y NL, donde se aplicó el glifosato, a distintos tiempos y se compararon con las muestras de las parcelas bajo laboreo tradicional (LT) en ausencia de herbicida. En ambos experimentos, se analizó el carbono hidrosoluble (CH), el carbono y el nitrógeno de la biomasa microbiana (CBM y NBM) así como las actividades dehidrogenasa (DHA) y β -glucosidasa (β -glu).

Los resultados demostraron que el glifosato actuó como una fuente de carbono orgánico en ambos los ensayos, aunque la estimulación de CBM, NBM, DHA y β -glu fue más evidente y perduró más en el ensayo de incubación. En este ensayo, los valores máximos para CBM, NBM y DHA se registraron entre los 18 y los 37 días después de la aplicación del herbicida, mientras que los valores más altos de β -glu

en las muestras de LR se registraron después 101 días. En el ensayo bajo condiciones de campo, este efecto fue mucho menos pronunciado.

Bajo las condiciones experimentales descritas (Entisol, clima Mediterráneo, agricultura de secano, rotación trigo-girasol-guisante forrajero), es aconsejable dejar pasar un intervalo de tiempo estándar de al menos 30 días entre la aplicación del glifosato y el muestreo del suelo, para evitar interpretaciones erróneas de los datos. No obstante, es necesario evaluar caso por caso las diferencias que se pueden originar en el metabolismo del glifosato debidas a diferentes condiciones y cultivos.



Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage

M. Panettieri *, L. Lazaro, R. López-Garrido, J.M. Murillo, E. Madejón

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, IRNAS-CSIC, PO Box 1052, 41080 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2013

Received in revised form 20 May 2013

Accepted 22 May 2013

Keywords:

Herbicide

Enzymatic activities

Conservation agriculture

Microbial biomass carbon

Soil quality

ABSTRACT

In conservation tillage (CT) the use of herbicides is often required. Glyphosate ($C_3H_8NO_5P$, *N*-phosphonomethylglycine) is one of the most used herbicides. Since biochemical parameters are often used as soil quality indexes, the stimulation effects on these indexes induced by CT could be misinterpreted due to the required application of herbicide. The objective of this work was to establish the effect of glyphosate on soil biochemical parameters and how long did these effects last on a sandy clay loam Entisol in SW Spain under different tillages.

To test the hypothesis that glyphosate could lead to an erroneous evaluation of biochemical parameters when different tillages are compared, two experiments were carried out in 2011: (i) the first one was conducted under incubation conditions; no-tillage (NT) and reduced tillage (RT) pots with and without herbicide addition were compared, after sunflower (*Helianthus annuus* L.) sowing, during 101 days; (ii) in the second one, samples were directly collected from an experimental farm after wheat (*Triticum aestivum* L.) sowing; NT and RT soil samples where glyphosate was applied were compared for 60 days with plots under traditional tillage in the absence of glyphosate.

Biochemical parameters such as water soluble carbon (WSC), microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN), as well as dehydrogenase (DHA) and β -glucosidase (β -Glu) activities were analyzed in both experiments.

Results showed that glyphosate acted as a source of organic carbon in both experiments, however, stimulation effects on MBC, MBN, DHA and β -Glu were more evident and lasted longer for the incubated samples. In this experiment, the maximum values for MBC, MBN and DHA were registered between 18 and 37 days after application, while higher β -Glu values under reduced tillage were still registered after 101 days. Those effects were less noticeable in the on-field experiment.

Under our experimental conditions (Entisol, Mediterranean condition, rainfed agriculture, wheat–sunflower–fodder pea rotation), an interval of at least 30 days between glyphosate application and soil sampling should be adopted as a standard to avoid data misinterpretation. Differences in glyphosate metabolism are expected for different conditions and crops and should be evaluated case by case.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Conservation agriculture (CA) constitutes the most important change in soil management in modern agriculture (Lal et al., 2007). FAO define CA as “the agriculture that aims to achieve sustainable and profitable methods that improves livelihoods of farmers through the application of three main principles: minimal soil disturbance, permanent soil cover and crop rotations”. Among conservation agriculture, conservation tillage is the collective umbrella term that is commonly given to no-tillage, direct drilling,

minimum tillage or ridge-tillage to denote that the specific practice has a conservation goal of some nature.

Normally, the retention of 30% surface cover by residues characterizes the lower limit of classification for conservation tillage but other objectives include time, fuel and water savings, and improvement of soil quality.

Numerous researches have pointed out the positive effects of CA in soil quality under rainfed conditions in the Mediterranean basin (Álvaro-Fuentes et al., 2008; Melero et al., 2011; Mrabet et al., 2001). The CA increases soil organic carbon (SOC) by preventing carbon losses operated by erosion and mineralization (Engel et al., 2009) and by adding fresh carbon sources proceeding from crop residues. Carbon storage has several environmental benefits since agriculture is responsible for 20% of CO_2 emission (Lal, 2004). Soils under CA also showed higher microbial activities and better physical properties compared with corresponding soils

* Corresponding author. Tel.: +34 954624711; fax: +34 954624711.
E-mail addresses: marco.panettieri@csic.es, marcopanettieri@gmail.com (M. Panettieri).

under traditional tillage (TT) (Franzluebbers, 2004). Furthermore, water infiltration and water loss prevention displayed higher values under CA and these characteristics are particularly relevant under Mediterranean conditions that could turn into semi-arid conditions, like those in the southwest of Spain (Moreno et al., 1997). However, one of the common problems under CA is the absence of a preliminary tillage that eliminates weeds before seeding procedures. In these conditions, farms always need herbicides to prevent weeds proliferation. This practice causes contamination and chemical persistence in soil, and groundwater pollution after percolation. Glyphosate ($C_3H_8NO_5P$, N-phosphonomethylglycine) is one of the most important herbicide in the world and the most sold in the USA. Glyphosate mode of action is to inhibit the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, which catalyses the reaction of shikimate-3-phosphate and phosphoenolpyruvate to form 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate. That results in the total inhibition of the synthesis pathway of three fundamental amino acids: phenylalanine, tyrosine and tryptophan. The shikimate pathway is not present in vertebrate metabolism and this makes glyphosate relatively non-toxic for human, reptiles and mammals.

Many soil enzymes can be used as indicators of soil quality for sustainable management because they are sensitive to ecological stress and land management (Benedetti and Dilly, 2006). Enzymes may react to changes in soil more quickly than other physico-chemical variables and therefore may be useful as early indicators of biochemical changes (Melero et al., 2008; Nannipieri, 1994). Evidence of the stimulation effect of herbicides on soil biochemical properties has been reported (Benitez et al., 2006; García-Ruiz et al., 2008; Reinecke et al., 2002), even if herbicides are not designed to directly interact with soil enzymes (Speir and Ross, 2002). However, other authors defined as negligible the effect of glyphosate on soil microbial communities (Busse et al., 2001). Gianfreda and Rao (2008) reported that this effect is concentration-dependent and herbicide type-dependent and Zabaloy et al. (2008) described glyphosate as the herbicide with the most pronounced stimulation effect on soil biochemical properties if compared with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and metsulfuron-methyl. The main objective of this work was to evaluate the effect of glyphosate on various biochemical indicators of soil quality in soils under conservation tillage in Mediterranean, rainfed conditions. We hypothesize that the herbicide presence could have a time dependent effect on soil biochemical properties. To test the hypothesis two different experiments were carried out: one under controlled conditions and another one directly under field conditions. Parameters like water soluble carbon (WSC), microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN) and the activity of two enzymes (dehydrogenase, DHA, and β -glucosidase, β -Glu) were determined.

2. Materials and methods

2.1. Experimental area

The selected plots were situated on “La Hampa” experimental farm of the “Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC)” ($37^{\circ}17' N$, $6^{\circ}3' W$), located 13 km southwest of the city of Seville (Spain). Since 2008, 9 plots on the farm were managed under different tillage practices, in order to evaluate the changes originated by tillage on soil quality. The soil is an Entisol (Xerofluvic, Soil Survey Staff, 1999) with a sandy clay loam texture (clay content of about 250 g kg^{-1} , 210 g kg^{-1} silt and 540 g kg^{-1} sand), pH of around 7.8 (calcareous), Kjeldahl nitrogen concentration of 950 mg kg^{-1} , Olsen phosphorus concentration of 18.8 mg kg^{-1} and alkaline-earth carbonates concentration of 280 g kg^{-1} . The climate of the zone is typically Mediterranean,

with mild rainy winters (484 mm mean annual rainfall) and very hot and dry summers. The mean annual temperature at the experimental site is around $17^{\circ}C$, the maximum and minimum mean monthly temperatures were $33.5^{\circ}C$ and $5.2^{\circ}C$ registered in July and January, respectively.

For the on-field experiment, samples collected from three tillage treatments were directly compared: traditional tillage (TT), reduced tillage (RT) and no-tillage (NT). The experiment was carried out in a completely randomized block design with three replicates per treatment. For the incubation experiment, soil cores proceeding from the same plots were used to fill the incubation pots.

The TT consisted of a pass of mouldboard plough (to a depth of 25–30 cm) and two or three cultivator passes at a depth of 15–20 cm and a disc harrow pass at a depth of 15 cm. RT was characterized by the lack of mouldboard ploughing and by a reduction in the number of tillage operations (only chisel plough at a depth of 20–25 cm, every two years and a yearly disc harrowing at a depth of 5–7 cm were retained) as well as by leaving the crop residue on the soil surface. NT was characterized by the absence of tillage (direct drilling) in which the residue is left on the soil surface until it decays, except sunflower stalks, which were broken into smaller pieces before the next crop was sown. The percentage of the soil surface covered by residue in both the RT and NT treatments was determined by stretching a 10 m cord (marked every 10 cm) diagonally across several rows of each conservation tillage (CT) subplot as reported by Plaster (1992). The number of marks touching a piece of crop residue gave the percentage of coverage. In our case, the percentage of residues covering the soil surface was greater than 60% in both CT treatments, and this confirmed that conservation tillage was established correctly in both cases.

A wheat (*Triticum aestivum* L.)–sunflower (*Helianthus annuus* L.)–fodder pea (*Pisum arvense* L.) crop rotation was established. The sunflower and fodder pea crops were not fertilized (as it is traditional in this zone), while wheat received 100 kg ha^{-1} (fertilizer complex) with no top dressing fertilizer. Weeds were controlled by tillage in TT and by the application of pre-emergence herbicides in CT, at a rate of 4 L ha^{-1} glyphosate (36%).

2.2. Incubation experiment

For the incubation experiment, a week after fodder pea harvest on May 2011, two different areas of 1 m^2 were delimited at random in each one of the 6 plots corresponding to conservation tillage systems (3 plots under NT and 3 under RT), for a total of 12 selected areas. In one of this area for each plot, the herbicide was applied (GLYFOS Ultra, Agrodan, which contains 36% glyphosate) at a dose equivalent to 10 L ha^{-1} that corresponds to the maximum recommended by the manufacturer's label. To ensure the homogeneity of the application a sprayer was used. The second area for each plot was used as a control, for a total of 6 areas with glyphosate application and 6 control areas, equally distributed between NT and RT plots.

After the application of the herbicide, undisturbed soil samples coming from each one of the 12 areas were taken using PVC cylinders. These cylinders contained approximately the top 15 cm of the soil profile and were immediately transferred to 12 pots of similar diameters; a total amount of 600 cm^3 (about 750 g) was placed in each pot. The soil profile (0–15 cm depth) remained unaltered after this operation.

The pots with soil samples were brought to the laboratory, and they were placed at random in a chamber under controlled conditions (between 22 and $24^{\circ}C$, photoperiod of 18 h light and 6 of dark and light intensity: $111 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) where they remained throughout the time that the experiment was developed.

In order to prepare the sowing, distilled water was added to bring the water content of soil to 70% of its total water holding

capacity ($0.295 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O cm}^{-3}$). Five sunflower seeds were sown by hand in each pot, at a depth of 4–6 cm, and they were placed at the maximum possible distance from each other.

The pots were watered several times a month simulating natural rainfall from the 20th of February to the 10th of June (normal time of crop development). The total amount of water applied was 206 L m^{-3} divided into 3 big precipitation events (from the 13th to the 23rd day of incubation: 55 L m^{-3} ; from the 58th to the 63rd day of incubation: 40 L m^{-3} ; and from the 68th to the 71st day of incubation: 40 L m^{-3}) and 6 smaller precipitation events. Surface soil samples (0–5 cm) in each pot were collected 0, 17, 37, 57 and 101 days after the application (DAA) of the herbicide.

2.3. On-field experiment

The on-field experiment started in December 2011, immediately after glyphosate application (GLYFOS Ultra, Agrodan, which contains 36% glyphosate). The herbicide dose applied was raised in order to equal the one used for the incubation experiment (10 L ha^{-1}).

Samples were collected at three different times: immediately after application ($T = 0$), 30 ($T = 30$), and 60 ($T = 60$) days later, while wheat was sown 10 days after glyphosate application. Three treatments were evaluated for this experiment, NT and RT where glyphosate was applied, and TT, in which there was no glyphosate application. Three soil cores were collected from each plot at two depths (0–5 and 5–10 cm) to create a composite sample per replicate, treatment and depth for a total of 18 samples. The moist soil coming from the field was sieved ($<2 \text{ mm}$) and divided into two sub-samples. One was immediately stored at 4°C in loosely tied plastic bags to ensure sufficient aeration and prevent moisture loss prior to assaying for biochemical analyses. The other was air-dried for chemical analysis. Biochemical analyses were carried out within 2 weeks.

2.4. Biochemical analyses

In sub-samples, the microbial biomass carbon content (MBC) and nitrogen content (MBN) were determined by the chloroform fumigation–extraction method modified by Gregorich et al. (1990) and Brookes et al. (1985), respectively. Concentrations of C and N in the extract were measured by a TOC V-CSH Shimadzu analyzer equipped with a total-N analyzer unit.

In air-dried subsamples, at the beginning of the experiment, total organic carbon (TOC) concentration was measured by dichromate oxidation and titration with ferrous ammonium sulfate (Walkley and Black, 1934).

Dehydrogenase (DHA) was determined according to Trevors (1984) after soil incubation with INT (2(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl) 5-phenyl tetrazolium chloride) and the produced iodonitrotetrazoliumformazan (INTF) absorbance at 490 nm was measured with a Perkin Elmer Lambda EZ210 spectrophotometer. β -Glucosidase activity (β -Glu) was measured as indicated by Eivazi and Tabatabai (1988), after soil incubation with p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside and the produced p-nitrophenol absorbance at 400 nm was measured.

Water soluble carbon (WSC) was determined in a (1/10) aqueous extract by shaking at 150 rpm for 1 h. The aqueous extract was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min and measured using a TOC V-CSH Shimadzu analyzer.

2.5. Statistic

Data normality was tested prior to analysis. Significant differences originated by glyphosate application during the incubation experiment were shown by a Student's *t*-test at $p < 0.05$, in which soil samples with glyphosate were individually compared with corresponding samples without glyphosate.

Soil differences before glyphosate application and for field experiment were analyzed by running a univariate analysis of variance (ANOVA) to test whether there was a significant effect of the treatments (tillage) on each one of the studied parameters.

The correlation matrix of the variables studied was based on Pearson correlation coefficients ($p < 0.05$ and $p < 0.01$). Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results and discussion

3.1. Preliminary data

Tillage already showed an important effect on biochemical properties at the beginning of this experiment (Table 1). That means that the “in situ” quality of the surface soil was higher in plots under NT than those in TT at initial time. Other studies have demonstrated the increase of the biochemical parameters in soils under conservation agriculture and especially under no-tillage (Doran, 1980; Eivazi et al., 2003; Madejón et al., 2007), whereas other studies have related CA successes to specific climatic conditions (Lal et al., 1989; Moreno et al., 1997).

In this experiment, the preliminary data showed that NT was the most efficient practice to enhance TOC, MBC, MBN, and DHA, whereas data for β -glucosidase showed no significant differences between treatments. In soils under RT, differences with TT were not significant, except for WSC content, probably due to the short time of establishment of the experiment, indeed Kladičko et al. (1986) and Madejón et al. (2007) demonstrated that RT improves soil quality at the surface in long-term experiments.

3.2. Incubation experiment

The experiment under controlled conditions has pointed out that, as time proceeds, biochemical properties, except MBN and DHA, have decreased (Figs. 1 and 2).

Overall, for both types of conservation tillages, higher WSC values were observed for treatments with glyphosate until 57 DAA (Fig. 1a and b). Glyphosate itself is a source of water soluble and easily available carbon and the application of the herbicide may have slightly increased WSC content. Several authors reported that some of glyphosate most important metabolites such as

Table 1
Mean values and standard errors of total organic carbon (TOC), water soluble carbon (WSC), microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), microbial biomass carbon to nitrogen ratio (MBC/MBN), dehydrogenase activity (DHA) and β -glucosidase activity (β -Glu), in soil under no-tillage (NT), reduce tillage (RT) and traditional tillage (TT) at the beginning of the experiment (0–5 cm depth).

Treatment	TOC (g kg^{-1})	WSC (mg kg^{-1})	MBC (mg kg^{-1})	MBN (mg kg^{-1})	MBC/MBN	β -Glu ($\text{mg p-nitrophenol h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil}$)	DHA ($\text{mg INTF kg}^{-1} \text{ DW soil}$)
NT	$10.55 \pm 0.66\text{b}$	$73.1 \pm 6.5\text{ab}$	$609 \pm 15\text{b}$	$73.6 \pm 24.4\text{b}$	8.39a	$175 \pm 14\text{a}$	$1.81 \pm 0.25\text{b}$
RT	$8.65 \pm 0.87\text{a}$	$93.1 \pm 4.9\text{b}$	$495 \pm 22\text{a}$	$23.7 \pm 1.7\text{a}$	21.0b	$134 \pm 15\text{a}$	$1.63 \pm 0.31\text{ab}$
TT	$7.72 \pm 0.26\text{a}$	$66.8 \pm 4.8\text{a}$	$529 \pm 12\text{a}$	$28.1 \pm 4.6\text{a}$	19.7b	$130 \pm 10\text{a}$	$1.15 \pm 0.12\text{a}$

$n = 9$. Significant differences between treatments are indicated with different letters ($p < 0.05$).

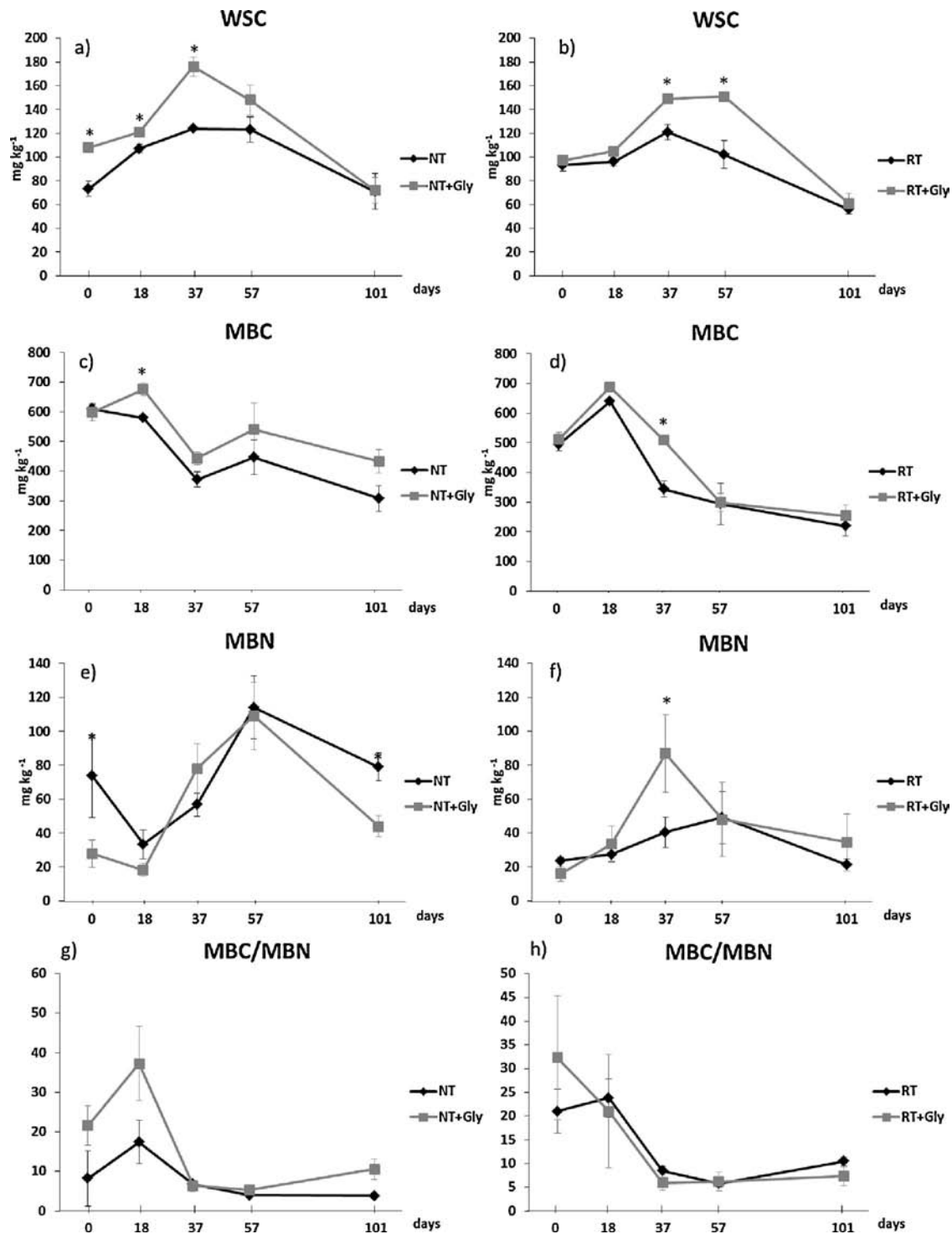


Fig. 1. Mean values and standard errors (referred to dry weight soil) after 0, 18, 37, 57 and 101 days of incubation for water soluble carbon (WSC), microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), microbial biomass carbon to nitrogen ratio (MBC/MBN) in soil under no-tillage with glyphosate, NT + Gly, and without, NT (a, c, e, g), and under reduced tillage with glyphosate, RT + Gly, and without, RT (b, d, f, h). Significant differences between paired values are marked by an asterisk ($p < 0.05$), $n = 60$.

sarcosine (Kishore and Jacob, 1987), glyoxylic acid and especially aminomethylphosphonic acid (AMPA) (Dick and Quinn, 1995) were very persistent in soil and could be responsible for most of the effects observed after glyphosate application (Obojska et al., 1999; Roberts et al., 1998).

The presence of glyphosate increased MBC contents in both treatments under conservation tillage (Fig. 1c and d), however, significant differences were only found in the analyses performed at 18 DAA in NT and at 37 DAA in RT. From 57 DAA differences

between treatments with and without herbicide were not significant. The increase of MBC contents in the treatments with glyphosate may be related to the increase of labile C sources, however no significant correlations were found between this parameter and the WSC (Table 2).

For the MBN, a clear pattern was not observed. After an initial negative effect of glyphosate in both conservation treatments, values in soils with and without glyphosate were very similar (Fig. 1e and f).

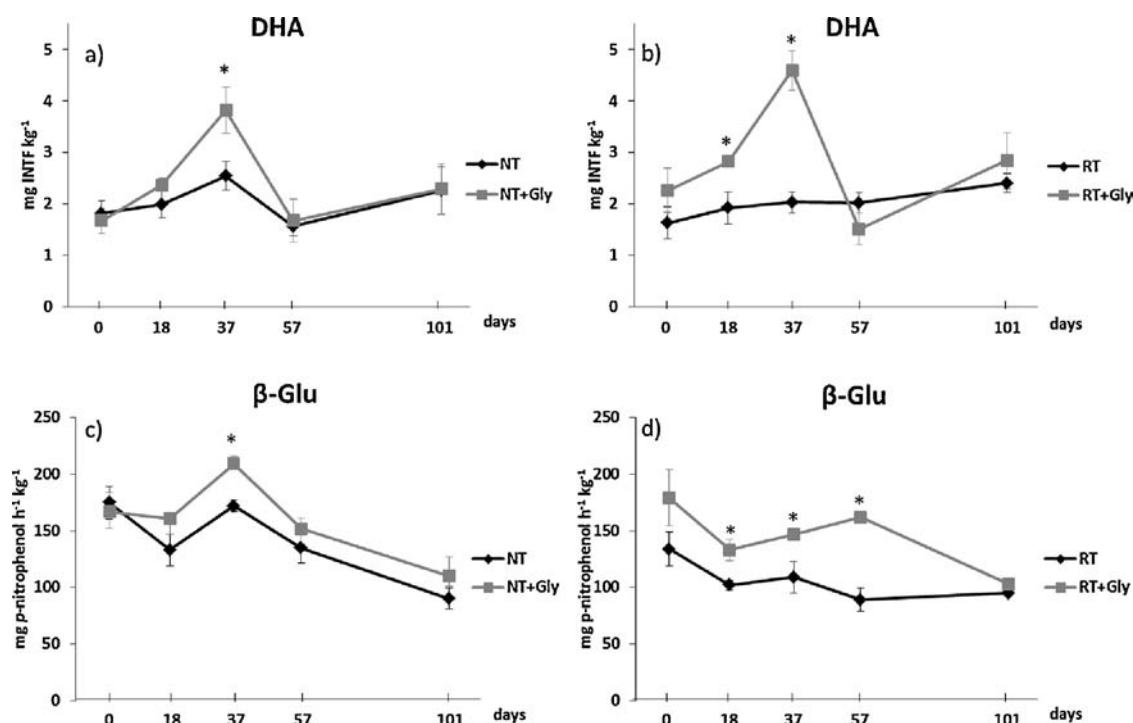


Fig. 2. Mean values and standard errors (referred to dry weight soil) after 0, 18, 37, 57 and 101 days of incubation for dehydrogenase activity, DHA, and for β-glucosidase activity, β-Glu, in soil under no-tillage with glyphosate, NT + Gly, and without, NT (a and c), and under reduced tillage with glyphosate, RT + Gly, and without, RT (b and d). Significant differences between paired values are marked by an asterisk ($p < 0.05$), $n = 60$.

Several authors have studied the effects of glyphosate on soil microorganisms, with controversial results. While, [Gomez et al. \(2009\)](#) observed a decrease of MBC, [Haney et al. \(2000\)](#) observed no effect on either the MBC or MBN contents, and yet, [Wardle and Parkinson \(1990\)](#) found a slight increase in these parameters in the first days after application of herbicide.

The ratio MBC/MBN showed a decrease during the first two samplings of the incubation period followed by a plateau (Fig. 1g and h). This ratio was higher in soils with glyphosate at the beginning of the experiment, and it demonstrated the positive effect of the herbicide on biomass carbon just after the glyphosate application. After 37 DAA values of this ratio were very similar for all treatments with and without glyphosate. Most bacteria have lower MBC/MBN ratios than fungi ([Sarathchandra et al., 1988](#)) and our results showed a decrease in the MBC/MBN ratio between the beginning and the end of the incubation, which could have been due to a change in population caused by the experimental conditions. Indeed, [Araújo et al. \(2003\)](#) reported a stimulation effect of glyphosate on fungi rather than on bacterial community. This effect normally evolves in a higher MBC/MBN ratio due to the higher MBC contained in fungal cells. In our study, water content of soil was not constant and incubation was carried out with artificial

lightning. Consequently, these different conditions may have led to different results from the [Araújo et al. \(2003\)](#) experiment.

In general, DHA values were higher in treatments with glyphosate, especially in the second and third samplings performed (17 and 37 DDA) (Fig. 2a and b). After this time, DHA values were similar for all treatments. These results agree with those found by other authors in experiments of application of glyphosate to assess its effect on soil enzymatic activities. [De Andréa et al. \(2003\)](#) and [Gomez et al. \(2009\)](#) observed an increase in activity in the first weeks after application of glyphosate while [Zabaloy et al. \(2008\)](#) found controversial effects of glyphosate on DHA depending on soil type. [De Andréa et al. \(2003\)](#) also found significant differences in DHA after a second glyphosate application, and they confirmed that the herbicide can stimulate oxidative processes in the soil. However, as in our experiment, two months after application no significant differences were detected and this data demonstrated that the effect of the herbicide in the DHA is temporary. This result shows that the activity is not inhibited by the herbicide and even experienced some stimulation. Several papers have shown an increase in this activity in soils under conservation tillage practices ([Doran, 1980](#); [Eivazi et al., 2003](#); [Madejón et al., 2007](#)). Since conservation tillage treatments often require herbicide application, we must take into account the possible stimulation effect when conservation treatments are compared with others in which glyphosate was not applied, as in case of TT.

For both conservation tillages, β-Glu was also stimulated by the presence of glyphosate (Fig. 2c and d). In the case of soils under NT, although values were generally higher in presence of herbicide, significant differences were only found at 37 DAA. In soils under RT the effect of glyphosate becomes clearer: significant differences were found after 18, 37 and 57 DAA, whereas no differences were found after 101 DAA. This corroborates the hypothesis of the influence of herbicide on β-Glu. Glyphosate degradation is co-metabolically performed and the decomposition rate should depend on the general activity of

Table 2

Correlation coefficients between the different soil chemical and biochemical properties of incubated soil.

	MBC	MBN	β-Glu	DHA
WSC	0.208	0.403**	0.364**	0.220
MBC	–	0.167	0.403**	0.041
MBN		–	0.153	0.189
β-Glu			–	0.133

$n = 60$. WSC: water soluble carbon; MBC: microbial biomass carbon; MBN: microbial biomass nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; β-Glu: β-glucosidase activity.

** Correlation is significant at the 0.01 level.

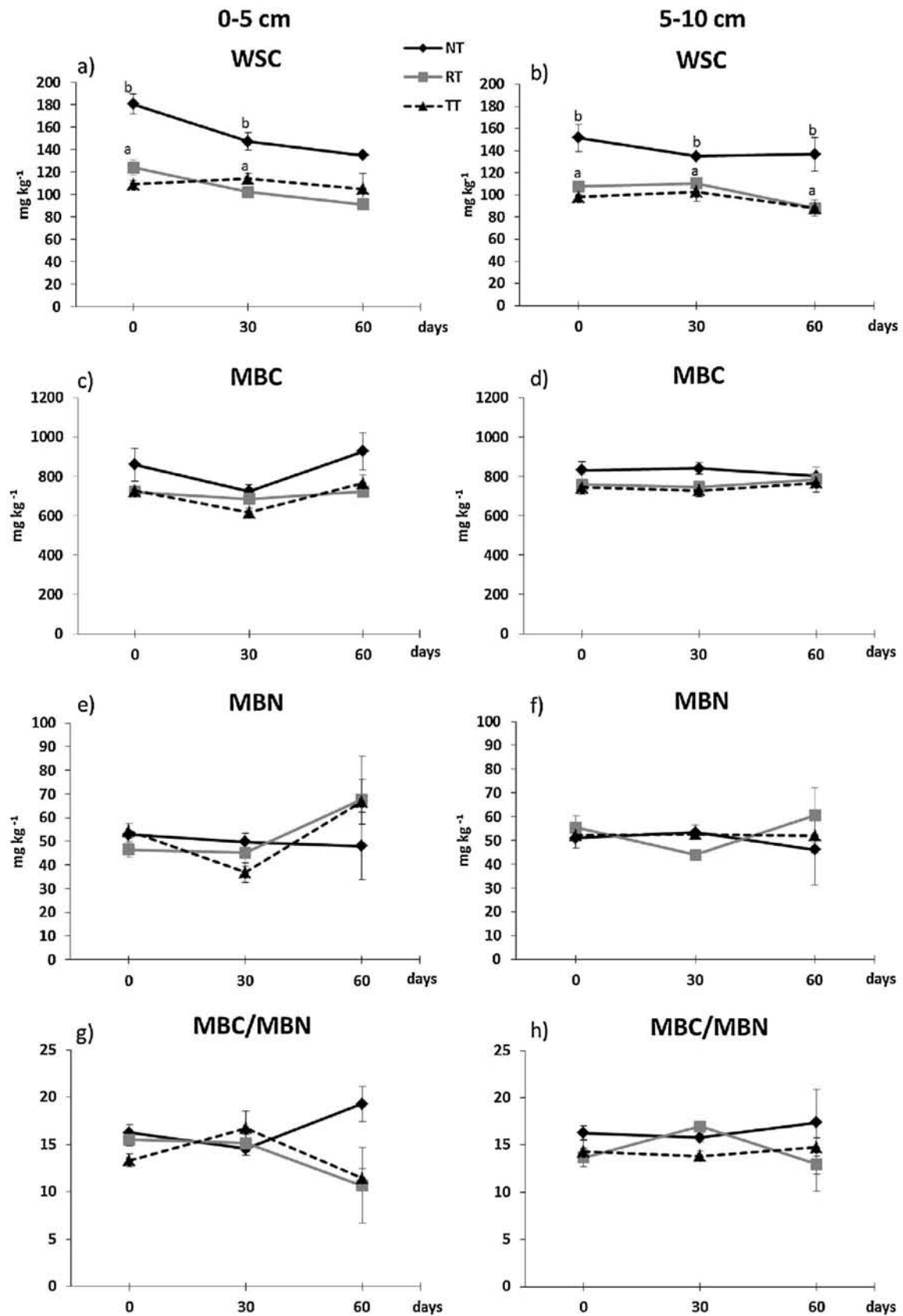


Fig. 3. Mean values and standard errors (referred to dry weight soil) obtained 0, 30 and 60 days after the application of glyphosate on field for water soluble carbon (WSC), microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), microbial biomass carbon to nitrogen ratio (MBC/MBN) in soil under no-tillage (NT) reduced tillage (RT) and traditional tillage (TT) at two depths: 0–5 cm (a, c, e, g) and 5–10 cm (b, d, f, h). Significant differences between paired values are marked by different letters ($p < 0.05$), $n = 54$.

Table 3

Correlation coefficients between the different soil chemical and biochemical properties of incubated soil, limited to treatments with glyphosate.

	MBC	MBN	β -Glu	DHA
WSC	0.362*	0.571**	0.498**	0.309
MBC	–	0.195	0.229	0.094
MBN		–	0.029	0.266
β -Glu			–	–0.015

$n=30$. WSC: water soluble carbon; MBC: microbial biomass carbon; MBN: microbial biomass nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; β -Glu: β -glucosidase activity.

* Correlation is significant at the 0.05 level.

** Correlation is significant at the 0.01 level.

soil microorganisms (Gimsing et al., 2004). Biodegradation products of glyphosate can be sarcosine – as the effect of direct activity of C–P lyase – and/or aminomethylphosphonic acid formed as the result of the activity of glyphosate oxidoreductase and glyoxylic acid (Obojska et al., 1999; Roberts et al., 1998). These compounds can act as a source of C and P for microorganisms to increase their activity. Moreover, β -Glu is an extracellular enzyme that has an impact beyond the life of the organism and lasts longer in time.

The results obtained by Pearson bivariate correlations between all the incubated soil samples (Table 2) showed that β -Glu was significantly correlated to WSC and MBC; furthermore, an unusual correlation between WSC and MBN was found for incubated soil samples. A better explanation of these results was obtained by separating samples on the basis of glyphosate application (Table 3): the correlation between MBN and WSC was stronger for this set of data, while it was not significant for samples without glyphosate (data not shown). Moreover, β -Glu maintained its correlation with WSC too; these data support our hypothesis that the herbicide application, considered as an addition of WSC source, could stimulate some enzymatic activities and also modify nitrogen cycles as reported by Ratcliff et al. (2006).

3.3. On-field experiment

After the results obtained during the incubation experiment, an on-field experiment was carried out in order to ensure whether or not glyphosate application was influencing microbial activities values up to 60 DAA also in agricultural plots.

Normally, results obtained for on-field experiments carried out in agricultural plots differ from those obtained for incubated soil, since meteorological factors such as temperature variations, light intensity, wind and rain strength could affect the degradation of many agrochemical products. Those changes could be related to stimulation or inhibition of microbial communities and/or to activation of other chemical oxidation patterns.

First of all, glyphosate could have caused a significant augment of WSC in NT superficial samples at the beginning of the experiment, since the herbicide itself is a source of water soluble carbon (Fig. 3a). A similar trend was detected in RT samples with a lower intensity, but not in TT samples, where glyphosate was not applied. For both conservation treatments, WSC values decreased with time. In NT samples, the same pattern was observed at 5–10 cm depth (Fig. 3b), probably due to a stimulation effect by the glyphosate on WSC during the first 30 days. Furthermore, for others on-field experiments, Araújo et al. (2003) and Veiga et al. (2001) confirmed that the persistence of herbicide and its metabolites (aminomethylphosphonic acid and glyoxylic acid) seemed to last about 30 days.

For the other parameters analyzed, no differences were found in 5–10 cm depth samples except for DHA activity at $T = 30$ (Fig. 3d, f, h; Fig. 4b and d). Values observed for MBN were highly dispersed and no evident trend was found (Fig. 3e and f). Although NT samples showed higher but not significant values of MBC at the surface, the evolution in time followed the same pattern of TT samples and both were comparable to RT ones and glyphosate did not seem to affect this organic C pool (Fig. 3c and d). Fig. 4 shows that the herbicide application in NT and RT plots did not produce

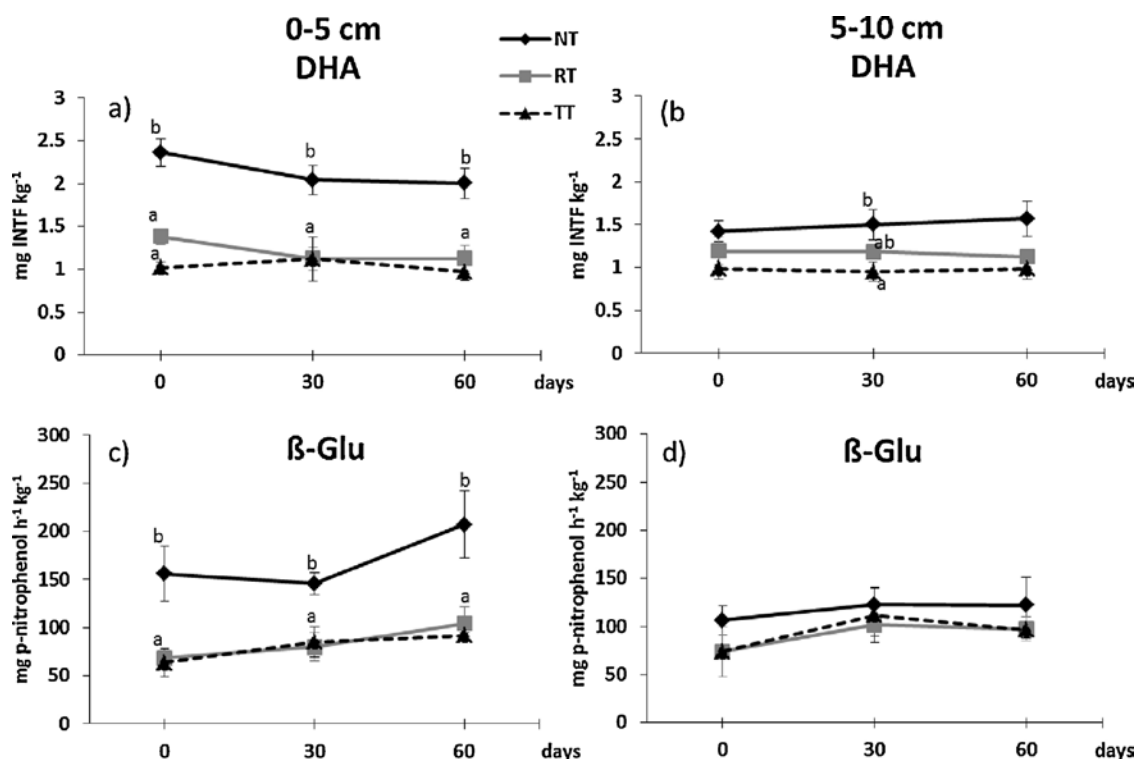


Fig. 4. Mean values and standard errors (referred to dry weight soil) obtained 0, 30 and 60 days after the application of glyphosate on field for dehydrogenase activity, DHA, and for β -glucosidase activity, β -Glu, in soil under no-tillage (NT) reduced tillage (RT) and traditional tillage (TT) at two depths: 0–5 cm (a, c) and 5–10 cm (b, d). Significant differences between paired values are marked by different letters ($p < 0.05$), $n = 54$.

Table 4

Correlation coefficients between the different soil chemical and biochemical properties of soil under on-field conditions.

	MBC	MBN	β -Glu	DHA
WSC	0.370**	−0.087	0.204	0.531**
MBC	–	0.171	0.402**	0.389**
MBN		–	−0.003	−0.146
β -Glu			–	0.719**

$n=54$. WSC: water soluble carbon; MBC: microbial biomass carbon; MBN: microbial biomass nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; β -Glu: β -glucosidase activity.

** Correlation is significant at the 0.01 level.

the same stimulation effects on enzymatic activities as in the incubated samples. Values of DHA activity at the surface were significantly higher under NT for all the samplings, but DHA intensity decreased with time and became constant after 30 days. These differences appeared to be more related to tillage than to glyphosate application, since the stimulation induced by herbicide for the incubation experiment occurred several days after the application and RT showed no differences when compared to TT. Significant differences at 5–10 cm depth were observed only at $T=30$ for NT if compared with TT, and once again could be principally related to tillage effects since both trends followed the same pattern along the experiment.

As observed for DHA, β -Glu values were significantly higher for NT surface samples when compared with TT and RT, however no differences were found at 5–10 cm depth. An upward trend for surface samples values was observed as time went, even for TT samples where glyphosate was not applied and this exclude the possibility of a stimulation effect directly attributable to the herbicide.

The coefficient obtained for the bivariate correlation (Table 4) reported a high positive correlation between both enzymatic activities studied, and also between DHA and WSC, DHA and MBC. Moreover, WSC and MBC were positively correlated among them, but β -Glu showed a positive correlation only with MBC and not with WSC. This latter result is difficult to explain, since β -Glu often showed a positive correlation with WSC in similar studies (Madejón et al., 2009; Melero et al., 2011) and further analyses are required to assess if glyphosate was responsible for WSC content alteration under field conditions.

Some authors (Araújo et al., 2003; Veiga et al., 2001) have shown that the persistence of glyphosate in soil ranged between 30 and 35 days in both on-field and incubation essays. However, this period may be longer in soils with high clay content. The soil of this experiment is a loam soil with moderate clay content and perhaps the persistence time of glyphosate goes something beyond these 35 days. This was especially true in the case of RT, whereas in NT the possible stimulation effect was not noticeable after 35–50 days.

The evaluation of these data demonstrated that the glyphosate could affect some biochemical parameters but the magnitude of the effect strongly depends on soil characteristic, crop type and climatic conditions. Extrapolation of these results could be difficult since previous studies ranged from a negligible effect of glyphosate on soil biochemical properties of ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) plantations in north California (Busse et al., 2001) to a pronounced stimulation effect on the same properties in Argentinian agricultural soils (Zabaloy et al., 2008).

4. Conclusion

The present study confirmed our hypothesis that glyphosate affects soil biochemical parameters. Results obtained for dehydrogenase and β -glucosidase activities in the incubation assay suggest

that glyphosate could cause a time dependent stimulation of both of these activities, probably by acting as a source of easily available carbon.

The presence of glyphosate should be taken into account in order to ensure that significant differences are due to the tillage effect and not to the herbicide stimulation, when the biochemical status of soils under different tillage systems is evaluated.

The magnitude and duration of this stimulation effect varied from the incubation experiment to the on-field experiment, where biodiversity, atmospheric and climatic conditions could enhance the glyphosate degradation.

These results suggest leaving time between glyphosate application and soil sampling in order to avoid data misinterpretation: the interval should be of about 50 days in case of dehydrogenase and up to 90 days under incubation conditions, while an interval of at least 30 days should be implemented for the on-field essays, for our experimental conditions. Due to the high variability of this stimulation effect, the interval should be adapted case by case depending on the soil and climate characteristics.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Interministerial Commission of Science and Technology (CICYT) through project AGL2010-22050-C03-03, which allowed this work to be carried out.

M. Panettieri thanks the European Social fund (ESR), CSIC, and the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain for funding his Ph.D. grant (JAE-PreDoc).

References

- Álvarez-Fuentes, J., Arrúe, J.L., Cantero-Martínez, C., López, M.V., 2008. Aggregate breakdown during tillage in a Mediterranean loamy soil. *Soil and Tillage Research* 101, 62–68.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R., Abarkeli, R.B., 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799–804.
- Benedetti, A., Dilly, O., 2006. Introduction to approaches to defining, monitoring, evaluating and managing soil quality. In: Bloem, J., Hopkins, D.A.B. (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI, Wallington, pp. 3–14.
- Benitez, E., Nogales, R., Campos, M., Ruano, F., 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology* 32, 221–231.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 17, 837–842.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J., Powers, R.F., 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 1777–1789.
- De Andréa, M.M., Peres, T.B., Luchini, L.C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M.B., Tedeschi Savoy, V.L., 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 1329–1335.
- Dick, R.E., Quinn, J.P., 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 545–550.
- Doran, J.W., 1980. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Science Society of America Journal* 44, 765–771.
- Eivazi, F., Bayan, M.R., Schmidt, K., 2003. Select soil enzyme activities in the historic Sanborn Field as affected by long-term cropping systems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34, 2259–2275.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 20, 601–606.
- Engel, F.L., Bertol, I., Ritter, S.R., Paz González, A., Paz-Ferreiro, J., Vidal Vázquez, E., 2009. Soil erosion under simulated rainfall in relation to phenological stages of soybeans and tillage methods in Lages, SC, Brazil. *Soil and Tillage Research* 103, 216–221.
- Franzluebbers, A.J., 2004. Tillage and residue management effects on soil organic matter. In: Magdoff, F., Weil, R.R. (Eds.), *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. CRC Press, Boca Raton, pp. 227–268.
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., 2008. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 2137–2145.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., 2008. Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 38, 269–310.

- Gimsing, A.L., Borggaard, O.K., Jacobsen, O.S., Aamand, J., Sørensen, J., 2004. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology* 27, 233–242.
- Gomez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., Fernandez, E., 2009. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45, 163–167.
- Gregorich, E.G., Wen, G., Voroney, R.P., Kachanoski, R.G., 1990. Calibration of a rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* 22, 1009–1011.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* 48, 89–93.
- Kishore, G.M., Jacob, G.S., 1987. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 12164–12168.
- Kladivko, E.J., Griffith, D.R., Mannering, J.V., 1986. Conservation tillage effects on soil properties and yield of corn and soya beans in Indiana. *Soil and Tillage Research* 8, 277–287.
- Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1–22.
- Lal, R., Logan, T.J., Fausey, N.R., 1989. Long-term tillage and wheel traffic effects on a poorly drained mollic ochraqualf in northwest Ohio. 2. Infiltrability, surface runoff, sub-surface flow and sediment transport. *Soil and Tillage Research* 14, 359–373.
- Lal, R., Reicosky, D.C., Hanson, J.D., 2007. Evolution of the plow over 10,000 years and the rationale for no-till farming. *Soil and Tillage Research* 93, 1–12.
- Madejón, E., Moreno, F., Murillo, J.M., Pelegrín, F., 2007. Soil biochemical response to long-term conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 94, 346–352.
- Madejón, E., Murillo, J.M., Moreno, F., López, M.V., Arrue, J.L., Alvaro-Fuentes, J., Cantero, C., 2009. Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil and Tillage Research* 105, 55–62.
- Melero, S., Panettieri, M., Madejón, E., Macpherson, H.G., Moreno, F., Murillo, J.M., 2011. Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in SW, Spain: effect on soil quality. *Soil and Tillage Research* 112, 107–113.
- Melero, S., Vanderlinden, K., Ruiz, J.C., Madejón, E., 2008. Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *European Journal of Soil Biology* 44, 437–442.
- Moreno, F., Pelegrín, F., Fernández, J.E., Murillo, J.M., 1997. Soil physical properties, water depletion and crop development under traditional and conservation tillage in southern Spain. *Soil and Tillage Research* 41, 25–42.
- Mrabet, R., Ibno-Namr, K., Bessam, F., Saber, N., 2001. Soil chemical quality changes and implications for fertilizer management after 11 years of no-tillage wheat production systems in Semiarid Morocco. *Land Degradation & Development* 12, 505–517.
- Nannipieri, P., 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. CISRO Publication, Australia, pp. 238–244.
- Obojska, A., Lejczak, B., Kubrak, M., 1999. Degradation of phosphonates by streptomycete isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 872–876.
- Plaster, E.J., 1992. *Soil Science and Management*, 5th ed. Delmar Publishers, New York.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology* 34, 114–124.
- Reinecke, A.J., Helling, B., Louw, K., Fourie, J., Reinecke, S.A., 2002. The impact of different herbicides and cover crops on soil biological activity in vineyards in the Western Cape, South Africa. *Pedobiologia* 46, 475–484.
- Roberts, F., Roberts, C.W., Johnson, J.J., Kyle, D.E., Krell, T., Coggins, J.R., Coombs, G.H., Milhous, W.K., Tzipori, S., Ferguson, D.J.P., Chakrabarti, D., McLeod, R., 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* 393, 801–805.
- Sarathchandra, S.U., Perrott, K.W., Boase, M.R., Waller, J.E., 1988. Seasonal changes and the effects of fertiliser on some chemical, biochemical and microbiological characteristics of high-producing pastoral soil. *Biology and Fertility of Soils* 6, 328–335.
- Soil Survey Staff, 1999. *Soil taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*, U.S. Department of Agriculture Handbook, 2nd ed., vol. 436. Natural Resources Conservation Service.
- Speir, T.W., Ross, D.J., 2002. Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 407–431.
- Trevors, J.T., 1984. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology & Biochemistry* 16, 673–674.
- Veiga, F., Zapata, J.M., Fernandez Marcos, M.L., Alvarez, E., 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Science of the Total Environment* 271, 135–144.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29–38.
- Wardle, D.A., Parkinson, D., 1990. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. *Plant and Soil* 122, 29–37.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Gómez, M.A., 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40, 1–12.

V.5. EFFECT OF PERMANENT BED PLANTING COMBINED WITH CONTROLLED TRAFFIC ON SOIL CHEMICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES IN IRRIGATED SEMI-ARID MEDITERRANEAN CONDITIONS

Resumen

Efectos del cultivo en lomos permanentes combinados con el tráfico controlado sobre las propiedades químicas y bioquímicas del suelo en una finca de regadío en condiciones mediterráneas semiáridas.

En condiciones semiáridas es necesario mejorar la calidad del suelo agrícola para reducir la erosión del suelo y optimizar la utilización del agua. La agricultura de conservación (AC) puede incrementar la biodiversidad y la calidad del suelo, y también reducir los costes de gestión tanto en secano como en regadío, sin que los cultivos pierdan productividad. No obstante, son escasos los estudios científicos sobre las propiedades químicas y bioquímicas del suelo en fincas de regadío bajo AC en la región mediterránea. Los lomos permanentes con retención de residuos (LP) se propusieron como una alternativa a los lomos labrados convencionalmente con la incorporación de residuos en el suelo (LT). A lo largo de 2 campañas de cultivo (2009 y 2010), estos dos sistemas de manejo, combinados con el control de tráfico de la maquinaria, se compararon en un suelo de tipo franco aluvial Typic Xerofluvent bajo una rotación Maíz (*Zea mais*, L.) - Algodón (*Gossypium hirsutum*, L.) establecida en el año 2007. Después de la cosecha, en surcos y lomos, se analizaron los contenidos de carbono orgánico total (COT), carbono hidrosoluble (CH), nitrógeno Kjeldahl (N-Kjel), actividades deshidrogenasa (DHA) y β -glucosidasa (β -glu) y carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana (CBM y NBM). Los resultados evidenciaron que el N-Kjel, el COT y las actividades enzimáticas fueron significativamente más altas en las muestras de suelo de los surcos del tratamiento LP, que en las de LT, pero prácticamente no se encontraron diferencias en las muestras de los lomos. Además, el tráfico de la maquinaria no produjo ningún efecto en los parámetros químicos y bioquímicos, pese al efecto de compactación que ejerce. Las diferencias más evidentes se encontraron entre muestreos, debido a

la diferente cantidad y tipología de los residuos (maíz y algodón). El análisis de componentes principales confirmó que en esta finca de regadío bajo condiciones mediterráneas, COT, N-Kjel y β -glu (y DHA en menor medida) son indicadores viables de los cambios originados por el manejo del suelo en la calidad del mismo; sin embargo, el CH, un buen indicador de calidad del suelo en agricultura de secano, no resultó serlo en este caso. Los resultados confirmaron que la agricultura de conservación es la mejor opción para mejorar la calidad biológica y bioquímica del suelo en fincas de regadío bajo condiciones mediterráneas semiáridas.



Effect of permanent bed planting combined with controlled traffic on soil chemical and biochemical properties in irrigated semi-arid Mediterranean conditions

M. Panettieri ^{a,*}, I. Carmona ^b, S. Melero ^a, E. Madejón ^a, H. Gómez-Macpherson ^b

^a Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, IRNAS-CSIC, PoBox 1052, 41080 Sevilla, Spain

^b Instituto de Agricultura Sostenible, IAS-CSIC, Apartado 4084, 14080 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2012

Received in revised form 12 February 2013

Accepted 13 February 2013

Keywords:

Conservation agriculture

Crop residues

Enzymatic activities

Microbial biomass

Soil organic matter

ABSTRACT

Improving agricultural soil quality in semi-arid regions is necessary for reducing soil erosion and improving water use. Conservation agriculture (CA) can increase soil quality and biodiversity, and reduce operational costs without losing crop productivity both under irrigated or rainfed conditions. However, few studies on soil chemical and biochemical status in irrigated farms under CA in the Mediterranean region are available. Permanent beds with crop residue retention (PB) have been proposed as an alternative to conventionally tilled beds with residue incorporation into the soil (CB). These two soil management systems combined with controlled traffic were compared during two different seasons (2009 and 2010) in a loamy alluvial Typic Xerofluvent soil under a maize (*Zea mays* L.)–cotton (*Gossypium hirsutum* L.) crop rotation trial established in 2007 in Southern Spain. Total organic carbon (TOC), water soluble carbon (WSC), Kjeldahl nitrogen (Kjel-N), dehydrogenase (DHA) and β -glucosidase (β -Glu) activities and microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN) were analysed in soil from beds and furrows after crop harvest. Results indicated that Kjel-N, TOC and enzymatic activities were significantly higher in soil from furrows in PB than in CB, but practically no differences were found in soil from the bed zone. Moreover, traffic did not affect chemical and biochemical parameters in spite of its compacting effect. Major differences were found between samplings due to different quantity and nature of the residues (maize vs. cotton). Principal component analysis confirmed that TOC, Kjel-N and β -Glu (and DHA to a less extent) are useful indicators of soil management impact on soil quality in this irrigated Mediterranean conditions; however, this is not the case of WSC, a common indicator in rainfed conditions. Results confirmed that conservation agriculture is the better option to increase soil biological and biochemical quality in irrigated farms under Mediterranean semi-arid conditions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Conservation agriculture (CA) has been proposed as a management strategy to improve the sustainability and profitability of the farming system in semi-arid regions (Kassam et al., 2009). The adoption of CA could in principle reduce irrigation water needs, risk of soil erosion and production costs (Jones et al., 2006; Sayre and Hobbs, 2004). Despite its potential benefits, CA adoption has been undertaken mainly by large scale farmers and for rainfed cropping (Sayre and Hobbs, 2004). However, irrigated agriculture accounts for about 40% of agricultural production (Molden et al., 2007). In the future, if enough food should be produced to fill global food needs, irrigation systems are expected to increase their contribution by improving their efficiency (Rosegrant et al., 2009). In view of this pressure, CA can play a key

role for improving sustainable intensification of irrigated cropping systems.

In irrigated Mediterranean agriculture, lack of adoption of CA is associated to the management of excessive crop residues and/or the possible soil compaction problems (Gómez-Macpherson et al., 2009). On a wet clay soil, one single wheel pass can compact the soil severely (Alakukku and Elonen, 1995) and such compaction has been associated with reduced yields (Raper et al., 2000). The traditional solution for soil compaction is tillage, an approach to be avoided under CA systems which aims at minimal soil disturbance. To avoid compaction, CA farmers may use low pressure wheels and restrict their traffic to specific paths by using GPS-controlled devices (Tullberg et al., 2007). When crops, such as cotton and maize, are planted on beds, traffic can be restricted to specific furrows, which can occasionally be deep-ripped (Boulal and Gomez-Macpherson, 2010). This avoids the requirement for special GPS-controlled machinery though all the equipment has to be adapted to fit the distance between furrows.

Several methods are used for maize and cotton crops under irrigation, ranging from intensive tillage such as deep ripping, disc-ploughing, chisel

* Corresponding author. Tel./fax: +34 954624711.

E-mail addresses: marco.panettieri@csic.es (M. Panettieri), inma@ias.csic.es (I. Carmona), smelero@irnase.csic.es (S. Melero), emadejon@irnase.csic.es (E. Madejón), hgozmez@cica.es (H. Gómez-Macpherson).

ploughing, and bed preparation, to minimum tillage or permanent beds (Gómez-Macpherson et al., 2009; McKenzie et al., 2003; Schoenfisch, 1999). By definition, a permanent bed implies that the bed stays in place for several seasons. The term permanent bed does not, however, imply that all soil disturbances are totally excluded as reforming may be needed before sowing. Maize and cotton crops have been cultivated on permanent beds successfully in Mexico and Australia (Hulugalle and Daniells, 2005; Sayre and Hobbs, 2004) but rarely in the Mediterranean basin countries (Boulal and Gomez-Macpherson, 2010).

Numerous researches have pointed out the positive effects of CA in soil quality under rainfed conditions in the Mediterranean basin (Álvarez-Fuentes et al., 2008; Madejón et al., 2009; Melero et al., 2011; Mrabet et al., 2001); however, little is known about these effects under irrigation. To define soil quality, the simple operational definition of Gregorich et al. (1994) may be used: 'The degree of fitness of a soil for a specific use'. In this sense, soil quality depends on the use and the management of the soil (Singer and Ewing, 2000). In terms of agricultural production, high soil quality equates to the ability of the soil to maintain a high productivity without significant soil or environmental degradation (Govaerts et al., 2006) and to promote plant and animal health. Interest in defining soil quality has focused on identifying some properties that affect soil health and quality (Doran and Parkin, 1994) but a more appropriate approach could be the use of indices based on a combination of different soil properties (Trasar-Cepeda et al., 2000). For example, microbial biomass and soil enzymes have been suggested as potential indicators of soil quality because of their relationship to soil biology, ease of measurement, rapid response to changes in soil management and high sensitivity to temporary soil changes originated by management and environmental factors (Jiménez et al., 2002; Marx et al., 2001).

The aim of this work was to assess the effects of a permanent bed system combined with controlled traffic on several soil chemical and biochemical properties related to soil quality. Both furrow and bed zones in an irrigated maize-cotton rotation under semi-arid Mediterranean conditions were evaluated. Results were compared to those obtained under conventional tillage also combined with controlled traffic. We hypothesized that: i) CA could have a positive effect in increasing soil fertility by enhancing soil organic matter and soil biological status 3 years after the introduction of the system; ii) soil biochemical properties could be bioindicators of the impact of management systems on soil quality also under irrigation.

To prove these hypothesis soil chemical properties such as total organic carbon (TOC), Kjeldahl-N (Kjel-N), and water-soluble carbon (WSC), and soil biochemical properties like microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN), dehydrogenase (DHA) and β -glucosidase (β -glu) activities were measured in furrows, with and without traffic, and in the centre of the beds in two cropping seasons. Some of these parameters provide a fast response to changes that originated by tillage, such as WSC, MBC, MBN, DHA and β -glu, whereas others needs more time to express differences, such as TOC, and Kjel-N.

2. Materials and methods

2.1. Study site and experimental design

The study was conducted at the Alameda del Obispo experimental farm (latitude 38°N, longitude 5°W, altitude 110 m), Cordoba, Spain. The climate is Mediterranean with a mean annual rainfall of 595 mm, most of it occurring from late autumn to early spring. Accumulated rainfall during agricultural seasons included in this study (September 2008–September 2009 and September 2009–September 2010) was 526 and 992 mm, respectively. The amount of irrigation water applied during the same years was 357 and 438 mm, respectively. The maximum and minimum mean temperatures were similar in both seasons (Fig. 1).

The soil is a loamy alluvial, Typic Xerofluvent (Soil Survey Staff, 1999), Eutric Fluvisol according to FAO system (Fitzpatrick, 1980). Particle-size distribution in the upper soil layer (0–15 cm) is 351 g kg⁻¹ sand, 443 g kg⁻¹ silt, and 206 g kg⁻¹ clay. The pH (1:2.5 water extract) and the electrical conductivity were 8.4 and 0.3 dS m⁻¹, respectively.

2.2. Crop rotation and management

Since the start of the trial, cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and maize (*Zea mays* L.) production was rotated every year (cotton: 2007 and 2009, maize: 2008 and 2010). No crops were planted during the winter fallow periods. Crop management from 2007 to 2009 has been described in detail by Boulal et al. (2012). For this experiment only 2009 and 2010 crops were evaluated. In 2009, cotton (cv. Juncal) was sown on the 14th of May and hand-harvested on the 29th of September. This crop did not receive fertilizers, according to local recommendations. In 2010, a few days after cotton residues were chopped up, maize (cv. Sancia) was sown on the 9th of April and hand-harvested on the 6th of September. The maize crop fertilization consisted of 90 kg ha⁻¹ each of N, P and K broadcasted 6 days after sowing and one top dressing application of urea 46% (280 kg ha⁻¹) on 10th May 2010. Pre-sowing, pre-emergence and post-emergence herbicide treatments were applied to control weeds. Hand weeding was necessary 2 or 3 times in some areas of both crops. Treatments for insect control were applied when necessary. In the case of cotton, integrated pest-management practices were followed.

2.3. Soil management systems

The experimental plot (0.78 ha) was initially ploughed April 2007 using a double pass of a disc harrow approximately 15 cm deep, a single pass of a chisel plough 25 cm deep, and a single pass of a rotavator 15 cm deep. Raised beds spaced 0.85 m apart were created three days later. In early 2008 the plot was divided into three 18×144-m blocks, which were each subjected to two tillage treatments: 1) permanent beds not subjected to tillage with crop residues left on the soil surface, hereafter referred to as "PB"; and 2) conventional beds formed annually and crop residues ploughed into the soil, hereafter referred to as "CB". Every year, following crop harvest, crop residues were mowed and left on the soil surface. In the case of CB, residues were incorporated into the soil under a ploughing regime that differed slightly from year to year. In February 2008, the CB plots were ploughed with a double pass of a disc harrow followed by a single pass of a chisel plough. In February 2009, residues in CB were incorporated into the soil with a single pass of a chisel plough followed by a single pass of a rotavator. In April 2010, residues in CB were incorporated during soil preparation that consisted of a single pass of subsoiling (60 cm deep) and a single pass of a disc harrow followed by a single pass of both a chisel plough and a cultivator (kongskilde).

Traffic was strictly controlled in the experimental plots. Ten furrows were formed in each plot, with five furrows subject to wheeled traffic (+T) alternating with five furrows not subject to wheeled traffic (−T). The separation width between two trafficked furrows was 1.70 m, which was imposed by the width between the rear tires (2.08 m) and the rear tire width (0.38 m) of the tractor used. Following the initial ploughing in April 2007, non-trafficked furrows in PB (PB−T) were not traversed with wheeled equipment during the study. In CB, after tillage and bed formation, the two types of furrows (+T and −T) were marked. CB−T furrows were not traversed by wheeled equipment until the soil was ploughed the following year. In +T furrows the number of wheeled passes per year varied between 5 and 9. For further details on the type of equipment used in each treatment see Boulal et al. (2012).

2.4. Residue measurements

Crop residues were collected from four random points on furrows with and without traffic (F+T and F−T, respectively) and on the bed.

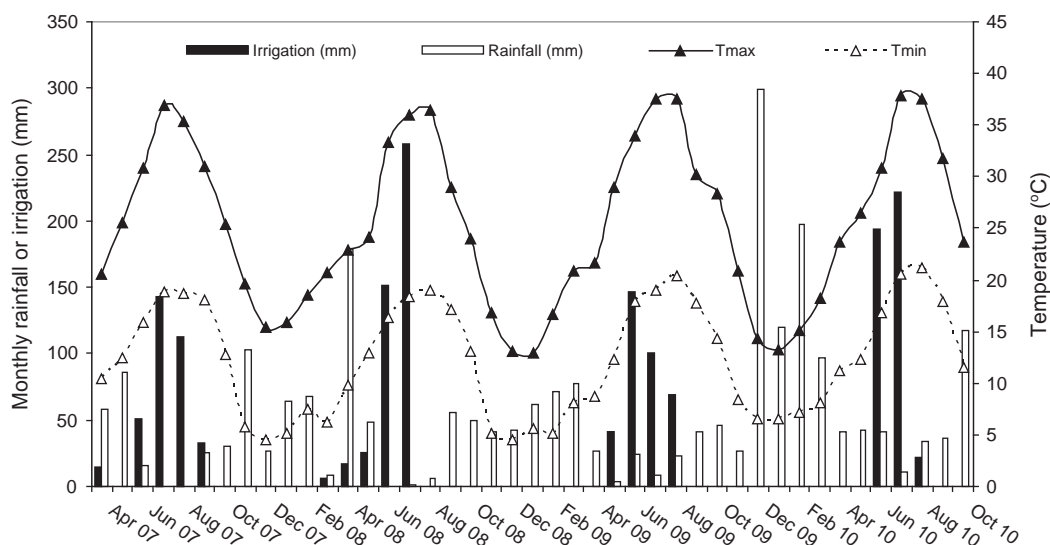


Fig. 1. Monthly precipitation (rainfall and irrigation) and average maximum and minimum temperature (Tmax and Tmin, respectively) between April 2007 and October 2010.

The area sampled at each point was $0.59 \times 0.50 \text{ m}^2$ and $0.26 \times 0.50 \text{ m}^2$ in the furrows and bed, respectively. Residue samples were washed to remove soil. Standing residues were collected separately. All components were dried at 75°C to constant weight and mass per unit area was calculated. Samples were taken once after planting and once after harvest: on 31st March and 28th of November in 2008, on 19th of June and 14th of October in 2009 and on 23th of March in 2010. Data for 2008 and 19 June 2009 were taken from (Boulal et al., 2012).

2.5. Soil sampling and chemical and biochemical analysis

Soil samples were taken at the end of each cropping season in 2009 and 2010 (Sampling 1C and Sampling 2M, respectively) following harvest. At the time of sampling period 1 (26th of October), cotton stalks were left standing on the beds, while the furrows contained mostly maize residues from the previous year. By sampling period 2 (4th of November), maize plants (stalks and leaves) were still standing on the beds while the furrows contained cotton crop residues from the previous year mixed with a small quantity of maize residues from 2008.

Three samples were taken per treatment and block in the centre of beds and in adjacent F+T and F–T furrows, 9 samples for each treatment and sampling area for a total of 54. Soil samples were collected at 0–10 cm depth in furrows and 0–20 cm in beds. The soil was sieved (2 mm) and stored at 4°C for a few days to prevent moisture loss before assaying for microbiological analysis. One sub-sample was air dried for chemical analysis.

In air-dried subsamples, total organic carbon (TOC) was analysed by dichromate oxidation and titration with ferrous ammonium sulphate according to Walkley and Black (1934) and Kjeldahl-N by the method described by Hesse (1971). Water soluble carbon (WSC) was determined in an (1/10) aqueous extract using a TOC-VCSH/CSN Shimadzu analyser.

In moist-field subsamples, the microbial biomass carbon content (MBC) and nitrogen content (MBN) were determined by the chloroform fumigation–extraction method modified by Gregorich et al. (1990) and Brookes et al. (1985), respectively. Dehydrogenase activity was determined according to Trevors (1984) after soil incubation, with INT (2(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl) 5-phenyl tetrazolium chloride) as the electron acceptor and measurement of iodonitrotetrazolium formazan (INTF) absorbance at 490 nm. β -glucosidase activity was measured as indicated by Tabatabai (1982) after soil incubation with *p*-nitrophenyl glucoside and measurement of *p*-nitrophenol absorbance at 400 nm. Results were based on the oven-dried weight of the soil.

2.6. Statistical analysis

Analyses were carried out separately for furrows and beds. Data normality was checked prior to analysis. In both zones, significant differences between systems were tested by a Student's *t*-test at $p < 0.05$. To check the effects of tillage system and traffic a multifactor analysis of variance (MANOVA) was performed. From this analysis, the significance level of each variable was obtained. The correlation matrix of all soil parameters in furrows was based on Pearson correlation coefficients ($p < 0.01$ and $p < 0.05$). Data from furrows were also treated by a Principal Component Analysis (PCA) to examine variation with respect to the different measured parameters. PCA was forced to generate only three eigenvalues. Statistical analyses were carried out using SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Crop residues

Grain in maize and lint (and seeds) in cotton crops were removed at harvest. The rest of the maize and cotton crops (stover) were left in the field (1290 g m^{-2} in 2008 maize for both systems and 445 and 345 g m^{-2} in PB and CB, respectively, in 2009 cotton) according to Boulal et al. (2012). In CB plots, crop residues were incorporated into the soil, whereas in PB plots they were left on the ground. Fig. 2 shows the evolution of residue's biomass on the ground in PB plots. As a rule, a higher amount of residues was found in the furrows than in bed zones, except at the beginning of the 2008 maize season. The highest amount was observed after maize harvest (November 2008 sampling): nearly 1200 g m^{-2} on the furrows and 330 g m^{-2} on the beds. These residues decayed during the winter season to around 50% when compared to values determined after cotton sowing in 2009 (June sampling). A similar pattern took place with post-harvest residues of cotton in 2009 (October sampling), which were reduced around 35% in furrows when compared to the values determined after maize sowing in March 2010 (Fig. 2).

3.2. Soil quality: Nitrogen, soil TOC fractions and enzymatic activities

Results obtained in furrows showed a great influence of tillage system on some of the analysed parameters (Table 1). Kjell-N, TOC and enzymatic activities (β -Glu and DHA) were significantly higher in soil under permanent beds (PB) than in conventional beds (CB)

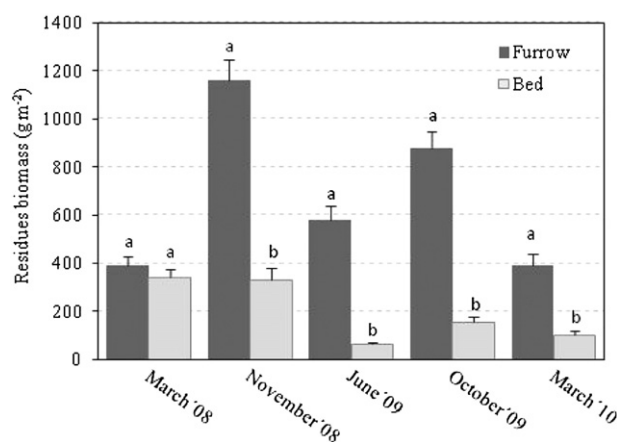


Fig. 2. Crop residues' biomasses in furrow and bed sections in the permanent bed system. For each date, values followed by different letter in the same bar differ significantly at $p < 0.05$. Vertical bars indicate the standard error.

in both seasons (Table 2). On the contrary, wheel traffic did not have a significant effect on any chemical or biochemical soil property studied (Table 1). No significant interaction between tillage and traffic was observed.

Moreover a clear influence of the sampling time was detected in almost all the parameters analysed in soil sampled in furrows (Table 2). The differences between the two samplings were especially noticeable for biochemical parameters (MBC, MBN, DHA and β -Glu) compared to those found in chemical parameters. Contents of MBC, DHA and β -Glu were higher in the first sampling after cotton harvest (Sampling 1C) than in the second after maize harvest (Sampling 2M) whereas the opposite was observed for MBN. The decrease between both samplings accounted ($p < 0.05$) between 48–83% for MBC, between 266–522% for DHA and between 61–92% for β -Glu. Values of TOC and N-Kjel were similar in both samplings.

Except for MBN in Sampling 1C, the tillage system did not have any effect on the analysed soil parameters in samples from bed centre (Table 3). In general, values of chemical and biochemical parameters obtained in PB were not statistically different than those obtained in CB. However, a remarkable decrease of MBC and enzyme activities was also observed in the second sampling (2M). Contents of MBN, as it occurred in furrows, were higher in the second sampling. Values of chemical parameters in beds were similar in both samplings, although a slight increase of TOC and a decrease of WSC were observed in Sampling 2M.

Among the chemical parameters measured in soil sampled in furrows, TOC and Kjel-N were highly correlated ($r = 0.816$, $p < 0.01$) whereas WSC was not correlated with any other variable. Among the biochemical parameters, β -Glu was significantly correlated ($p < 0.001$) with Kjel-N ($r = 0.834$), DHA ($r = 0.683$), MBC ($r = 0.530$) and TOC ($r = 0.683$). DHA was correlated with Kjel-N, β -Glu, MBC ($r = 0.662$, $p < 0.01$) and MBN ($r = 0.266$, $p < 0.05$).

3.3. Principal component analysis

Fig. 3 shows the graphical representation of chemical and biochemical properties in both samplings projected on the plain defined by the three first principal components. In Sampling 1C, eigenvalues from the PCA analysis indicated that the first three principal components (PC) accounted for 88.71% of the variance of data (PCI: 58.07%, PCII: 18.55%, PCIII: 12.09%). The first component was highly positively correlated with Kjel-N, β -Glu, DHA and TOC. The second component was positively correlated with Nitrogen and Carbon of microbial biomass (MBN and MBC) and the third component was only positively correlated with WSC (Table 4).

In Sampling 2M, the PCI, PCII and PCIII explained 55.21%, 19.20% and 12.56%, respectively, of the total variance (86.97%). Moreover, the correlations between principal components and the soil chemical and biochemical properties were similar to Sampling 1C.

4. Discussion

Little research on CA under irrigation in the Mediterranean region has been published. Results of this work show that the PB system conserved and increased soil total organic carbon in furrows compared to the conventional system (CB), and that obtained values were similar to those found after 26 years of no tillage in a rainfed wheat-based trial in a nearby location (Melero et al., 2009). The increase of organic matter under CA has been widely observed in rainfed conditions in the region (Álvarez-Fuentes et al., 2008; Cantero-Martínez et al., 2003; Madejón et al., 2009). Several works have demonstrated that organic matter increases under CA as a result of physical protection of soil organic matter within more stable aggregates, reduced aeration and reduced plant residue contact with the soil (Mikha and Rice, 2004; Puget and Lal, 2005). The residues in PB protect the soil from raindrop impact whereas in CB the lack of a protective cover increases soil susceptibility to further disruption (Boulal et al., 2011a; Six et al., 2000). Moreover, surface residues tend to decompose more slowly than soil-incorporated residues (CB), because of greater fluctuations of temperature and moisture in surface and reduced availability of nutrients to microbes colonising the residues (Schomberg et al., 1994). However, Verhulst et al. (2011) did not find an effect of the CA system on soil organic carbon after 3 years of establishing a similar trial that compared irrigated PB and CB in northern Mexico. In their case, the soil was a Vertisol in which the organic carbon in CB might have been relatively protected (compared to our loamy soil) and the wheat monocropping probably produced less than half of the stover produced in our study.

The effects of PB on total soil nitrogen generally reflect those of organic matter as the nitrogen cycle is closely linked to the carbon cycle. An accumulation of organic matter in soil confers important improvements in soil quality, soil fertility and carbon sequestration (Six et al., 2000). Furthermore, tillage reduces micro and macrofauna populations in comparison with systems without tillage (Kladivko, 2001), thus decreasing their potentially positive effect on physical properties (Six et al., 2004). In our study, the tillage system had also an effect on soil biochemical properties in furrows and this effect was especially remarkable for β -Glu activity.

Table 1

Tillage system and traffic effects on the studied soil chemical and biochemical properties in furrows.

Treatment	TOC (g kg ⁻¹)	MBN (mg kg ⁻¹)	MBC (mg kg ⁻¹)	WSC (mg kg ⁻¹)	Kjel-N (g kg ⁻¹)	β -glu (mg p-nitrophenol kg ⁻¹ dw soil)	DHA (mg INT kg ⁻¹ dw soil)
(T)	***	ns	ns	ns	***	***	*
Traffic (Tr)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T × TR	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

TOC: total organic carbon; MBN: microbial biomass nitrogen; MBC: microbial biomass carbon; WSC: water soluble carbon; Kjel-N: Kjeldahl nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; β -glu: β -glucosidase activity. *Significant at the 0.05 probability level. **Significant at the 0.01 probability level. ***Significant at the 0.001 probability level. ns: not significant.

Table 2

Mean values \pm standard deviation of the studied soil chemical and biological properties in soil in the centre of furrows in the permanent bed (PB) and conventional bed (CB) performed after cotton harvest (Sampling 1C) and after maize harvest (Sampling 2M).

Tillage system		TOC (g kg ⁻¹)	MBN (mg kg ⁻¹)	MBC (mg kg ⁻¹)	WSC (mg kg ⁻¹)	Kjel-N (g kg ⁻¹)	β -glu (mg <i>p</i> -nitrophenol kg ⁻¹ dw soil)	DHA (mg INT kg ⁻¹ dw soil)
Sampling 1C	PB	10.9 \pm 3.05a	20.5 \pm 7.87a	461 \pm 220a	118 \pm 23a	1.4 \pm 0.32a	328 \pm 113a	4.65 \pm 1.33a
	CB	7.1 \pm 1.04b	17.8 \pm 8.61a	484 \pm 216a	107 \pm 27a	1.1 \pm 0.17b	169 \pm 44b	3.98 \pm 1.21a
Sampling 2M	PB	11.1 \pm 1.18a	33.1 \pm 16.4a	311 \pm 100a	81 \pm 40a	1.3 \pm 0.13a	204 \pm 54a	1.27 \pm 0.31a
	CB	8.4 \pm 1.04b	26.9 \pm 4.73a	264 \pm 49a	109 \pm 53a	0.9 \pm 0.10b	88 \pm 22b	0.64 \pm 0.21b

TOC: total organic carbon; MBN: microbial biomass nitrogen; MBC: microbial biomass carbon; WSC: water soluble carbon; Kjel-N: Kjeldahl nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; β -glu: β -glucosidase activity. Values followed by different letters for each tillage system and sampling are significantly different ($P < 0.05$).

β -glucosidase belongs to a group of enzymes that catalyzes the hydrolysis of various glycosides resulting in the release of smaller sugars. This enzyme has a central role in the carbon balance in soils because it degrades carbohydrates and provides substrate to the soil (De la Horra et al., 2003) and it is highly correlated with total organic carbon. Other authors have reported similar effects of tillage in β -Glu activity in annual wheat-based rainfed systems in the region (Madejón et al., 2007; Melero et al., 2009, 2011). Differences in β -Glu between samplings were probably related to the rotation as found by Melero et al. (2011).

For the rest of the biochemical properties analysed, the tillage system had little influence (Table 2). Longer time may be required to show up differences. For example, in Mexico, Limón-Ortega et al. (2006) found higher microbial biomass in PB compared to CB in a wheat-based irrigated system only ten years after the establishment of the trial. Otherwise biochemical properties seem to be more affected by the nature of the most abundant residue (maize in Sampling 1C and cotton in Sampling 2M). Crop residue type plays an important role in organic matter cycling due to differences in C/N ratio or quality and quantity of residue (Potter et al., 1998). In our study, maize and cotton residues differed in their capacity to affect soil organic matter cycling and quality. Maize residues were the most effective in increasing soil microbiological status. On the one hand maize produced more stover and residues on the ground compared to cotton (Fig. 2). On the other hand, cotton residues are poorer in easily-utilizable sugars and proteins, but richer in cellulose and hemicelluloses. Furthermore, cotton roots have a larger diameter and double C/N ratio than maize roots (Ghidey and Alberts, 1993). As a consequence, the organic carbon from cotton residues may have been more slowly incorporated within the soil organic matter than in the case of maize residues.

The PCA procedure allowed us to examine changes in chemical and in biochemical variables in relation to soil management. Multivariate analysis has proven to be effective in identifying soil properties that respond to agronomic practices (Monreal and Bergstrom, 2000). Results obtained for this analysis suggested that TOC, Kjel-N, β -glucosidase and, to a less extend, dehydrogenase were useful as indicators of management practices impact on soil quality. Additionally, dehydrogenase and β -glucosidase were useful indicators to reflect changes in soil total biological activity and biochemical status involved in the carbon cycle. The activities of both dehydrogenase and β -glucosidase showed a positive correlation with organic matter in both seasons. Microbial biomass

C and N had an important contribution in PCII but seemed to be worse indicators of soil quality than enzyme activities. The large amount of residues produced by maize probably had masked their contribution to PCA (Limón-Ortega et al., 2006). Additionally, sampling took place several months after soil preparation and the tillage effect may have been weak by then and overridden by the residue type effect (Feng et al., 2003). Although WSC content has been suggested as a reliable soil quality indicator for assessing the impact of different soil management in rainfed conditions (Madejón et al., 2007; Roldan et al., 2005), results from this experiment did not confirm this behaviour under irrigation. In general, the WSC was much lower than the values obtained in rainfed wheat-based experiments in the region (Madejón et al., 2009) and may reflect a rapid microbial response to irrigation (Reicosky et al., 1999). However, Roldan et al. (2005) did not find an effect of irrigation on WSC except in the no-tilled top 5 cm layer in a maize monocrop system in Mexico. In the present experiment, samples were collected from a 0–10 cm deep layer and this may have masked some differences at shallower depths between treatments. In addition, divergences in porosity and water permeability between the Vertisol studied by Roldan et al. (2005) and the Fluvisol studied in this experiment could have led to a different WSC distribution among soil profiles.

The differences due to the management system observed in furrows were not detected in the centre of the beds in which soil parameters were similar in both tillage systems (Table 3). The low organic matter in the centre of the PB beds was probably the result of the reduced amount of residues falling on this section as they tended to roll and accumulate in the furrows (Fig. 2). On the contrary, most roots will be in the bed section and they seemed to provide enough substrate in PB bed soil to reach similar values of measured parameters as in both the CB beds and furrows where all residues were incorporated into the soil.

Wheel traffic did not have a significant effect on any of the soil parameters studied (Table 1). This was unexpected as traffic results in soil compaction and lower water infiltration (Boual et al., 2011b) and therefore would have influenced soil microbial activity. The size of the sampled soil layer (10 cm) may have reduced any existing difference occurring in the top soil. Runion et al. (2004) found higher MBN and DHA content in trafficked areas than in non trafficked area only in the top 4 cm in no-till plots but not in deeper layers or in the conventional systems. Besides, Lee et al. (1996) did not find a consistent effect of traffic on MBC, probably because of the coarse textured soil they studied.

Table 3

Mean values \pm standard deviation of soil chemical and biological properties in soil in the centre of the permanent beds (PB) and conventional beds (CB) performed after cotton harvest (Sampling 1C) and after maize harvest (Sampling 2M).

Tillage system		TOC (g kg ⁻¹)	MBN (mg kg ⁻¹)	MBC (mg kg ⁻¹)	WSC (mg kg ⁻¹)	Kjel-N (g kg ⁻¹)	β -glu (mg <i>p</i> -nitrophenol kg ⁻¹ dw soil)	DHA (mg INT kg ⁻¹ dw soil)
Sampling 1C	PB	7.1 \pm 1.30a	14.0 \pm 4.90b	381 \pm 182a	114 \pm 42.5a	1.00 \pm 0.15a	119 \pm 29a	2.56 \pm 1.11a
	CB	7.1 \pm 0.92a	22.7 \pm 5.04a	436 \pm 206a	93 \pm 20.1a	1.06 \pm 0.13a	139 \pm 18a	2.95 \pm 0.67a
Sampling 2M	PB	8.0 \pm 0.71a	30.3 \pm 7.67a	309 \pm 47a	67 \pm 23.5a	0.96 \pm 0.08a	89 \pm 17a	0.66 \pm 0.18a
	CB	7.9 \pm 1.20a	28.2 \pm 4.24a	283 \pm 67a	89 \pm 57.7a	0.96 \pm 0.13a	99 \pm 13a	0.66 \pm 0.17a

TOC: total organic carbon; MBN: microbial biomass nitrogen; MBC: microbial biomass carbon; WSC: water soluble carbon; Kjel-N: Kjeldahl nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; β -glu: β -glucosidase activity. Values followed by the same letter for each treatment and sampling are significantly different ($P < 0.05$).

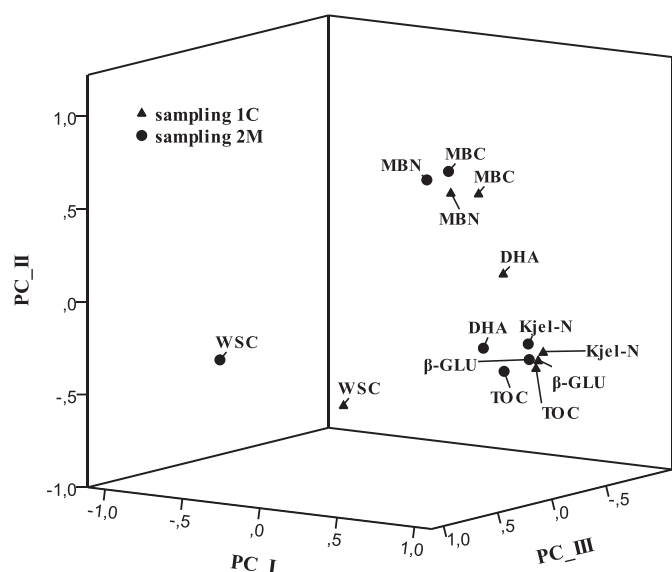


Fig. 3. Projected loadings of the soil chemical and biochemical properties measured in Sampling 1C (cotton) and Sampling 2M (maize) on the plain defined by the three first PCs. Kjel-N: Kjeldahl nitrogen; MBN: microbial biomass nitrogen; MBC: microbial biomass carbon; WSC: water soluble carbon; TOC: total organic carbon; DHA: dehydrogenase activity; β -GLU: β -glucosidase activity.

5. Conclusion

This study enriches the scarce literature regarding the effect of conservation agriculture on soil quality in irrigated maize-based systems in the Mediterranean region. The introduction of PB clearly resulted in an increased soil organic carbon in those zones where falling residues concentrated, i.e. furrows, and enhanced those enzymatic activities related with organic compounds metabolism, i.e. β -glucosidase, only 3 years after establishing the trial. These results complemented previous findings in this trial in which runoff in PB furrows had few sediments compared to runoff in CB furrows.

Moreover, significant results were found in furrows, while beds did not show important differences between tillage systems. This suggested that sampling under permanent beds should be taken in furrows zones to appreciate the improving effect of conservation agriculture under irrigation.

However, traffic did not affect any chemical or biochemical parameter, even if wheel passes have compacted the soil and reduced water infiltration. Residues' nature and their decomposition pattern influenced biochemical parameters more than other factors such as tillage and traffic. Furthermore, irrigation appears to affect WSC making it an unreliable

soil quality indicator for assessing the impact of different soil managements. Nevertheless, further research is needed on the evolution of soil chemical and biochemical properties in the long-term.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project AGL2010-22050-C03) and FEDER funds. The authors thank Dr J.M. Murillo for his useful comments on the manuscript. M. Panettieri and I. Carmona thank CSIC for his "JAE-Predoc" fellowship and her "JAE-Tec" contract, respectively. The authors thank M. Salmoral for field assistance.

References

- Alakukku, L., Elonen, P., 1995. Long-term effects of a single compaction by heavy field traffic on yield and nitrogen uptake of annual crops. *Soil and Tillage Research* 36, 141–152.
- Álvarez-Fuentes, J., López, M.V., Cantero-Martínez, C., Arrúe, J.L., 2008. Tillage effects on soil organic carbon fractions in Mediterranean dryland agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal* 72, 541–547.
- Boual, H., Gómez-Macpherson, H., 2010. Dynamics of soil organic carbon in an innovative irrigated permanent bed system on sloping land in southern Spain. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 139, 284–292.
- Boual, H., Gómez-Macpherson, H., Gómez, J.A., Mateos, L., 2011a. Effect of soil management and traffic on soil erosion in irrigated annual crops. *Soil and Tillage Research* 115–116, 62–70.
- Boual, H., Mateos, L., Gómez-Macpherson, H., 2011b. Soil management and traffic effects on infiltration of irrigation water applied using sprinklers. *Irrigation Science* 29, 403–412.
- Boual, H., Gómez-Macpherson, H., Villalobos, F.J., 2012. Permanent bed planting in irrigated Mediterranean conditions: short-term effects on soil quality, crop yield and water use efficiency. *Field Crops Research* 130, 120–127.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen in soil: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 837–842.
- Cantero-Martínez, C., Angas, P., Lampurlanés, J., 2003. Growth, yield and water productivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) affected by tillage and N fertilization in Mediterranean semiarid, rainfed conditions of Spain. *Field Crops Research* 84, 341–357.
- De La Horra, A.M., Conti, M.E., Palma, R.M., 2003. β -glucosidase and proteases activities as affected by long-term management practices in a typical argiudoll soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34, 2395–2404.
- Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J.W. (Ed.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Spec. Publ., 35. SSSA and ASA, Madison WI, pp. 3–23.
- Feng, Y., Motta, A.C., Reeves, D.W., Burmester, C.H., VAN Santen, E., Osborne, J.A., 2003. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1693–1703.
- Fitzpatrick, E.A., 1980. *Soils: Their Formation, Classification and Distribution*. Longman, London.
- Ghidey, F., Alberts, E.E., 1993. Residue type and placement effects on decomposition: field study and model evaluation. *Transactions of ASAE* 36, 1611–1617.
- Gómez-Macpherson, H., Boual, H., Mrabet, R., González, E., 2009. Rational and application of CA for irrigated production in southern Europe and north Africa. Invited paper in 4th World Congress on Conservation Agriculture Innovations for Improving Efficiency, Equity and Environment New Delhi, India, February, 4–7 2009, pp. 129–135.
- Govaerts, B., Sayre, K.D., Deckers, J., 2006. A minimum data set for soil quality assessment of wheat and maize cropping in the highlands of Mexico. *Soil and Tillage Research* 87, 163–174.
- Gregorich, E.G., Wen, G., Voroney, R.P., Kachanoski, R.G., 1990. Calibration of rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass. *C. Soil Biology and Biochemistry* 22, 1009–1011.
- Gregorich, E.G., Carter, M.R., Angers, D.A., Monreal, C.M., Ellert, B.H., 1994. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 74, 367–385.
- Hesse, P.R., 1971. *A Textbook of Soil Chemical Analysis*. John Murray, London.
- Hulugalle, N.R., Daniells, I.G., 2005. Permanent beds in Australian cotton production systems. In: Roth, C.H., Fisher, R.A., Meisner, C.A. (Eds.), *Evaluation and Performance of Permanent Raised Bed Cropping Systems in Asia, Australia and Mexico*. ACIAR, Canberra, Australia, pp. 161–171.
- Jiménez, M.P., De La Horra, A.M., Pruzzo, L., Palma, R.M., 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology and Fertility of Soils* 35, 302–306.
- Jones, R.E., Dowling, P.M., Michalk, D.L., King, W. McG., 2006. Sustainable grazing systems for the Central Tablelands of New South Wales. A bioeconomic framework for assessing the long-term economic benefits of grazing management tactics and implications for sustainability. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46, 496–502.
- Kassam, A., Friedrich, T., Shaxson, F., Pretty, J., 2009. The spread of conservation agriculture: justification, sustainability and uptake. *International Journal of Agricultural Sustainability* 7, 292–320.
- Kladiwko, E.J., 2001. Tillage systems and soil ecology. *Soil and Tillage Research* 61, 61–76.

Table 4

Correlation matrix of principal components with the soil chemical and biological properties studied.

	Sampling 1C			Sampling 2M		
	PCI	PCII	PCIII	PCI	PCII	PCIII
TOC	0.894	−0.343	−0.163	0.858	−0.325	0.080
MBN	0.595	0.623	0.196	0.491	0.697	0.269
MBC	0.705	0.616	0.097	0.531	0.726	0.126
WSC	0.339	−0.457	0.821	−0.446	−0.285	0.841
Kjel-N	0.887	−0.268	−0.240	0.935	−0.186	−0.033
β -glu	0.889	−0.306	−0.191	0.900	−0.282	−0.092
DHA	0.850	0.196	0.076	0.850	−0.175	0.260

TOC: total organic carbon; MBN: microbial biomass nitrogen; MBC: microbial biomass carbon; WSC: water soluble carbon; Kjel-N: Kjeldahl nitrogen; DHA: dehydrogenase activity; β -glu: β -glucosidase activity. Sampling 1C: after cotton harvest; Sampling 2M: after maize harvest.

- Lee, W.J., Wood, C.W., Reeves, D.W., Entry, J.A., Raper, R.L., 1996. Interactive effects of wheel-traffic and tillage system on soil carbon. In: Remy, K.H. (Ed.), Proceedings 1995 Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture. Mississippi State University, USA, pp. 1–4.
- Limón-Ortega, A., Govaerts, B., Deckers, J., Sayre, K.D., 2006. Soil aggregate and microbial biomass in a permanent bed wheat-maize planting system after 12 years. *Field Crops Research* 97, 302–309.
- Madejón, E., Moreno, F., Murillo, J.M., Pelegrín, F., 2007. Soil biochemical response to long-term conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 94, 346–352.
- Madejón, E., Murillo, J.M., Moreno, F., López, M.V., Arrue, J.L., Alvaro-Fuentes, J., Cantero, C., 2009. Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil and Tillage Research* 105, 55–62.
- Marx, M.C., Wood, M., Jarvis, S.C., 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1633–1640.
- Mckenzie, D.C., Shaw, A.J., Rochester, I.J., Hulugalle, N.R., Wright, P.R., 2003. Soil and nutrient management for irrigated cotton. AGFACT No.P5.3.6. NSW Agriculture, p. 40.
- Melero, S., López-Garrido, R., Murillo, J.M., Moreno, F., 2009. Conservation tillage: short- and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 104, 292–298.
- Melero, S., López-Bellido, R.J., López-Bellido, L., Muñoz-Romero, V., Moreno, F., Murillo, J.M., 2011. Long-term effect of tillage, rotation and nitrogen fertiliser on soil quality in a Mediterranean Vertisol. *Soil and Tillage Research* 114, 97–107.
- Mikha, M.M., Rice, C.W., 2004. Tillage and manure effects on soil and aggregate-associated carbon and nitrogen. *Soil Science Society of America Journal* 68, 809–816.
- Molden, D., Burton, M., Bos, M.G., 2007. Performance assessment, irrigation service delivery and poverty reduction: benefits of improved system management. *Irrigation and Drainage* 56, 307–320.
- Monreal, C.M., Bergstrom, D.W., 2000. Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality. *Canadian Journal of Soil Science* 80, 419–428.
- Mrabet, R., Saber, N., El-Brahli, A., Lahlou, S., Bessam, F., 2001. Total, particulate organic matter and structural stability of a Calcixeroll soil under different wheat rotations and tillage systems in a semiarid area of Morocco. *Soil and Tillage Research* 57, 225–235.
- Potter, K.N., Torbert, H.A., Jones, O.R., Matocha, J.E., Morrison Jr., J.E., Unger, P.W., 1998. Distribution and amount of soil organic C in long-term management systems in Texas. *Soil and Tillage Research* 47, 309–321.
- Puget, P., Lal, R., 2005. Soil organic carbon and nitrogen in a Mollisol in central Ohio as affected by tillage and land use. *Soil and Tillage Research* 80, 201–213.
- Raper, R.L., Reeves, D.W., Burmester, C.H., Schwab, E.B., 2000. Tillage depth, tillage timing, and cover crop effects on cotton yield, soil strength, and tillage energy. *Applied Engineering in Agriculture* 16, 379–385.
- Reicosky, D.C., Reeves, D.W., Prior, S.A., Runion, G.B., Rogers, H.H., Raper, R.L., 1999. Effects of residue management and controlled traffic on carbon dioxide and water loss. *Soil and Tillage Research* 52, 153–165.
- Roldan, A., Salinas-García, J.R., Alguacil, M.M., Caravaca, F., 2005. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Applied Soil Ecology* 30, 11–20.
- Rosegrant, M.W., Ringler, C., Zhu, T., 2009. Water for agriculture: maintaining food security under growing scarcity. *Annual Review of Environment and Resources* 34, 205–222.
- Runion, G.B., Prior, S.A., Reeves, D.W., Rogers, H.H., Reicosky, D.C., Peacock, A.D., White, D.C., 2004. Microbial responses to wheel-traffic in conventional and no-tillage systems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35, 2891–2903.
- Sayre, K.D., Hobbs, P., 2004. Raised bed system of cultivation for irrigated production conditions. In: Lal, R., Hobbs, P.R., Hansen, D.O., Uphoff, N. (Eds.), Sustainable Agriculture and the International Rice–Wheat System. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 337–355.
- Schoenfish, M., 1999. MACHINE-pak — A Machinery Manual for the Cotton Industry. CRDC/University of Southern Queensland, Narrabri, NSW/Toowoomba, Qld, Australia.
- Schomberg, H.H., Steiner, J.L., Unger, P.W., 1994. Decomposition and nitrogen dynamics of crop residues: residue quality and water effects. *Soil Science Society of America Journal* 58, 372–381.
- Singer, M.J., Ewing, S., 2000. Soil quality. In: Sumner, M.E. (Ed.), Handbook of Soil Science. CRC Press, Boca Raton.
- Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 2099–2103.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K., 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research* 79, 7–31.
- Soil Survey Staff, 1999. Soil taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys, 2nd ed. Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook, 436.
- Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L., Miller, E.M., Keeney, D.R. (Eds.), Methods of Soil Analyses, Part 2, Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 903–947.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1867–1875.
- Trevors, J.T., 1984. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 673–674.
- Tullberg, J.N., Yule, D.F., McGarry, D., 2007. Controlled traffic farming — from research to adoption in Australia. *Soil and Tillage Research* 97, 272–281.
- Verhulst, N., Carrillo-García, A., Moeller, C., Trethowan, R., Sayre, K.D., Govaerts, B., 2011. Conservation agriculture for wheat-based cropping systems under gravity irrigation: increasing resilience through improved soil quality. *Plant and Soil* 340, 467–479.
- Walkley, A., Black, J.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29–38.

VI. Discusión

VI.1. DISCUSIÓN GENERAL.

Establecer un equilibrio entre producción agrícola y calidad medioambiental es un objetivo difícil de conseguir. El aumento de la población mundial estimula la agricultura intensiva para fines alimentarios, a lo que se suma la necesidad de obtener biomasa vegetal para obtener biocombustibles (compitiendo muchas veces con la producción de alimentos, Valentine *et al.*, 2012), papel y otros materiales de uso común en la vida moderna. El presente trabajo de Tesis se ha llevado a cabo en tres fincas de Andalucía Occidental, una región donde la agricultura extensiva constituye todavía el primer pilar económico y social. De ahí que disponer de sistemas agrícolas sostenibles desde un punto de vista medioambiental, que eviten los problemas de desertificación y erosión de suelos que afectan a extensas áreas de nuestro planeta, incluida España (Cerdá, 2008), resulta fundamental para conseguir producciones agrícolas rentables a largo plazo y asegurar un mínimo de bienestar social en amplios sectores de nuestra región.

Conseguir un buen rendimiento supone disponer no sólo de variedades productivas sino también de suelos de buena calidad. Es de sobra conocido que las malas prácticas agrícolas pueden deteriorar de forma irreversible la calidad de un suelo (Lal, 2000), de ahí que cada vez sean más numerosos los estudios orientados a disponer de índices sencillos que permitan evaluar la calidad del mismo (Doran *et al.*, 1994; Puglisi y Trevisan, 2012; Velasquez *et al.*, 2007; Weil y Magdoff, 2004; Zornoza *et al.*, 2008). Entre estos índices, pH y materia orgánica (MO) aparecen siempre en los distintos modelos propuestos, especialmente la MO como variable integradora de la mayoría de propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo (Weil y Magdoff, 2004). En general, la mayoría de estudios científicos sobre la dinámica de la MO y su valor como índice de calidad de suelos agrícolas tratan el tema desde un punto de vista cuantitativo, determinando el secuestro o la pérdida de carbono orgánico (CO) según las prácticas agrícolas establecidas, entre las que el tipo de laboreo tiene un papel fundamental. A pesar de la importancia que puede tener la acumulación de MO (Franzluebbers, 2004; Melero *et al.*, 2011; Weil y Magdoff, 2004) su caracterización a nivel molecular merece un esfuerzo adicional. Las pérdidas de MO se deben principalmente a la degradación de los restos vegetales que la componen por parte de los microorganismos del suelo, y a las

reacciones de oxidación química y fotoquímica, hasta llegar a compuestos más estables o estabilizados mediante la asociación con la fase mineral o la inclusión en agregados, como las fracciones húmicas, con la consecuente emisión de CO₂ y otros gases. Antes de producirse la completa oxidación a CO₂, las moléculas que componen la MO atraviesan varias etapas, pasando de un estado altamente reactivo y “atractivo” para los microorganismos, a estados más recalcitrantes o protegidos que tienden a acumularse en el suelo. Seguir esas etapas de degradación puede proporcionar datos muy interesantes sobre los cambios que una determinada práctica agrícola, laboreo en especial, origina en la estructura de la MO, indicando qué compuestos se ven más afectados por el sistema agrícola establecido. El desarrollo de nuevas técnicas y el estudio de los procesos bioquímicos que tienen lugar en el suelo nos permiten profundizar en el conocimiento de cómo el laboreo puede influir sobre la degradación de los residuos vegetales y en la sucesiva formación de materia orgánica más o menos estable (Kleber *et al.*, 2011; Kögel-Knabner *et al.*, 2008; Simpson *et al.*, 2011).

Una herramienta extremadamente potente para la caracterización de la MO es la resonancia magnética nuclear (RMN). Aunque la técnica en sí no se puede definir como novedosa, si lo es su aplicación en la ciencia de suelo y aún más en el tema del laboreo. La evaluación del estado de degradación de la MO puede proponerse como un indicador más de calidad del suelo, junto con otros indicadores como el carbono orgánico total (COT) o las actividades enzimáticas. Comparado con estos otros parámetros, los resultados obtenidos mediante RMN pueden proporcionar una respuesta a más corto plazo que el COT, siendo además menos sensibles a las variaciones climáticas, estacionales y de manejo que pueden experimentar las actividades enzimáticas. Por ejemplo, los xenobióticos (herbicidas) que se utilizan normalmente en las parcelas bajo laboreo de conservación (LC) pueden alterar el equilibrio bioquímico, inicialmente, de forma que se pueden interpretar erróneamente los resultados obtenidos si el muestreo de suelo no se realiza en el momento adecuado (Araújo *et al.*, 2003; Reinecke *et al.*, 2002; Zabaloy *et al.*, 2008).

Este aspecto, junto los estudios realizados sobre la influencia de distintos sistemas de laboreo (tanto en secano como en regadío) sobre la estructura molecular de la MO y, en general, calidad del suelo, se han plasmado en diversos artículos

científicos que constituyen el cuerpo central de este trabajo de Tesis Doctoral, los cuales se comentan a continuación.

VI.2. EFECTOS DE UNA LABOR INTENSIVA SOBRE UN SUELO EROSIONABLE PREVIAMENTE CULTIVADO BAJO NO-LABOREO.

- *Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in SW, Spain: Effect on soil quality.*

En el primer artículo (apartado V.1) se ha demostrado el efecto tan negativo que puede tener una labor ocasional de vertedera aplicada en un suelo con alto riesgo de erosión, cultivado bajo no laboreo (NL) desde su transformación en suelo agrícola a partir de bosque Mediterráneo. En general, la bibliografía especializada se centra en las mejoras introducidas por el laboreo de conservación, respecto al tradicional, en la calidad de los suelos (Lal *et al.*, 2007; Madejón *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2010). Sin embargo, son pocos los estudios científicos que evalúan el caso contrario, como el que presentamos en este trabajo.

El NL se caracteriza por la ausencia total de labores, salvo el pequeño surco que origina la rejilla de la maquinaria de siembra directa durante esta operación, y por dejar cubierta la superficie del suelo con los residuos del cultivo anterior (Gajri *et al.*, 2002; Plaster, 1992). Esto conlleva un consumo mínimo de combustible, un aumento de calidad del suelo a nivel bioquímico y una mayor fertilidad. Sin embargo, bajo las condiciones Mediterráneas típicas del suroeste de Andalucía, la adopción de NL puede llevar a una elevada compactación del suelo, que perjudica la germinación, y a una proliferación excesiva de malas hierbas. Por esta razón, es frecuente que los agricultores efectúen una labor ocasional de vertedera, chisel o subsolado, para paliar los efectos negativos que pudiera tener la compactación del suelo.

En la finca “Las Navas” (provincia de Cádiz), cultivada bajo NL en toda su extensión, se han evaluado los efectos de una labor de chisel y de vertedera sobre la calidad del suelo, tanto a nivel químico como bioquímico. Este estudio (tres profundidades de suelo y tres muestreos a lo largo de un año) ha demostrado la cuantiosa pérdida de materia orgánica que puede llegar a producirse a nivel superficial con un simple pase de vertedera, además de la pérdida de actividad

biológica, reflejada por la disminución de las actividades enzimáticas estudiadas. Por el contrario, una labor de chisel (laboreo reducido, LR), que también serviría para paliar problemas potenciales de compactación, no provocó los mismos descensos en las variables evaluadas. En las parcelas bajo LR, los valores de COT, y actividades β -glu y DHA se mantuvieron en niveles similares a los medidos en las parcelas bajo NL.

Todavía más importante que la pérdida de calidad, fue el efecto erosivo que ocasionó el pase de vertedera, reflejado por la aparición de amplias cárcavas (Figura III.8, III.9 y IV.1), que motivaron la inmediata suspensión del LT en las parcelas experimentales para evitar daños mayores. Las características del suelo de esta finca (Leptosol), con un horizonte “A” bastante superficial y la cercanía de la roca madre, caliza, a la superficie, junto con la presencia abundante de colinas (pendientes medianamente elevadas), hacen que se trate de un entorno con un elevado riesgo de erosión. La decisión de limitar cualquier tipo de labores en esa finca, adoptando el NL desde el inicio de su puesta en cultivo, contribuyó a establecer un equilibrio razonable frente a la erosión, equilibrio que se reveló extremadamente frágil ante cualquier labor agresiva, como puede ser la vertedera, dado que se estimó una pérdida de alrededor de 5 T ha^{-1} de carbono orgánico en los primeros 10 cm de suelo en las parcelas experimentales bajo LT.

En el caso de este experimento, la cosecha de veza del año 2008 resultó similar en todos los tratamientos ($1,67 \text{ T ha}^{-1}$ bajo NL, $1,69 \text{ T ha}^{-1}$ en LR y $1,66 \text{ T ha}^{-1}$ en LT), comprendidas, a su vez, en los intervalos normales que facilitan diversos autores para este cultivo (Hycka, 1980; Sánchez Girón *et al.*, 2004; Hernánz *et al.*, 2002). Los cambios drásticos originados por el LT en el equilibrio bioquímico y las pérdidas de COT no ocasionaron pérdidas de cosecha. Sin embargo, conviene puntualizar que los datos presentados se refieren a rendimientos potenciales, ya que fueron obtenidos a partir de la biomasa recolectada en pequeñas superficies (cuadrados de 1 m de lado), desgranándose los frutos (legumbres) a mano, en laboratorio (no se tiene en cuenta por tanto la pérdida de grano que siempre se produce en campo). Además, no se tuvieron en cuenta las cárcavas que la vertedera ocasionó en las parcelas correspondientes, que hubieran disminuido la cosecha, respecto a los restantes tratamientos, como consecuencia de la reducción de superficie cosechada.

➤ *Moldboard plowing effects on soil aggregation and soil organic matter quality assessed by ^{13}C CPMAS NMR and biochemical analyses.*

Tras conocerse la pérdida notable de calidad de suelo ocasionada por el LT, era lógico preguntarse por qué un único año de tratamiento había ocasionado cambios tan profundos a corto plazo. Según los datos bibliográficos, el LT es responsable de la ruptura de los macroagregados, tanto por la acción mecánica de la vertedera como por la disminución de la MO superficial (Álvaro-Fuentes *et al.*, 2009; Six *et al.*, 1999). En el proceso de formación de agregados del suelo, los residuos vegetales y la MO más humificada funcionan como núcleos y como agentes cementantes. La remoción y enterramiento de los residuos, junto con la elevada oxidación de MO ocasionada por la inversión del suelo bajo LT, perjudican la formación de agregados de mayor tamaño (Jastrow, 1996).

Teniendo en cuenta estos aspectos, en el trabajo “*Moldboard plowing effects on soil aggregation and soil organic matter quality assessed by ^{13}C CPMAS NMR and biochemical analyses*” se evaluaron los efectos del LT sobre distintas fracciones de agregados del suelo. Después de realizar un fraccionamiento físico, se analizaron diversos indicadores bioquímicos de calidad de suelos, junto con el análisis por RMN.

Se comprobó que la distribución del tamaño de agregados variaba en función del tipo de laboreo establecido. La utilización de vertedera se tradujo en la destrucción de los macroagregados de mayor tamaño (\varnothing 2-5 mm), coincidiendo con los resultados obtenidos en otros trabajos (Jiao *et al.*, 2006; Plaza-Bonilla *et al.*, 2010; Six *et al.*, 1999). Por el contrario, la distribución de agregados en las parcelas bajo LR fue similar a la obtenida bajo NL.

Los espectros obtenidos por ^{13}C CPMAS RMN fueron muy similares entre los tratamientos, en las fracciones de mayor tamaño de las parcelas NL un pico a 152 ppm, ausente en las otras muestras, confirmó la presencia de derivados de lignina correspondientes a residuos de cultivo más frescos.

Después de la evaluación cualitativa, se procedió a la integración de las regiones espectrales identificadas en la tabla III.1. Gracias a este análisis semicuantitativo, se pudieron apreciar diferencias sobre todo en las regiones alifática y *O*-alquílica. Los espectros correspondientes a LT se caracterizaron por una mayor cantidad de

alcanos comparado con los de LR y NL. Los alcanos son en general compuestos más recalcitrantes, que tienden a acumularse en el suelo y derivan del metabolismo microbiano o de la degradación incompleta de estructuras más estables de las plantas. Por el contrario, los espectros correspondientes a NL y LR se caracterizaron por una mayor abundancia de compuestos *O*-alquílicos, normalmente identificados como carbohidratos (con una menor contribución de éteres y péptidos), típicos de residuos de cultivos frescos (Baldock y Preston, 1995; Kögel-Knabner y Ziegler, 1993; Preston y Trofymow, 2000).

Un indicador utilizado con frecuencia para evaluar los cambios que se originan en el suelo por acciones externas es la razón alquílicos/*O*-alquílicos. Un suelo que evolucione hacia valores mayores de esta razón tiende a conservar la MO en forma de estructuras más humificadas, mientras que valores más bajos de esta razón son típicos en suelos con un mayor aporte de MO fresca, como pueden ser los residuos del cultivo (Baldock y Preston, 1995). Bajo LT se obtuvieron razones hasta 50% más altas que las correspondientes razones obtenidas para NL y LR. Las diferencias mayores se obtuvieron para la fracción de Ø 0,5-1 mm, la más abundante en LT y con la que obtuvo el valor más alto para la razón alquílicos/*O*-alquílicos. Estos datos confirmaron que a corto plazo, la vertedera rompió los agregados de mayor tamaño, exponiendo la MO más fresca a la oxidación por parte de los microorganismos, que condujo a un enriquecimiento porcentual de MO más recalcitrante. Este fenómeno se fue acentuando debido a la falta de residuos frescos en la superficie de las parcelas bajo LT.

Estas diferencias en la composición de la MO se tradujeron en valores menores de COT, POxC, CBM y β -glu, en las parcelas bajo LT en todas las fracciones estudiadas, en comparación con las correspondientes parcelas bajo LR y NL. Todos esos parámetros están fuertemente relacionados con el metabolismo de la MO y su disminución confirma que el empobrecimiento de los “pools” más frescos de MO puede originar un descenso global de la calidad del suelo (Johnston *et al.*, 2009).

Los resultados científicos aportados por los dos trabajos descritos demostraron que la aplicación de la vertedera en fincas con suelos fácilmente erosionables no puede ser considerada una alternativa viable, aunque sólo se hiciera ocasionalmente. En casos de problemas de compactación o de proliferación de malas hierbas, es

aconsejable llevar a cabo labores menos agresivas, como podría ser el “chisel”, que en este ensayo no provocó daños considerables ni a nivel físico ni bioquímico.

VI.3. RELACIÓN TEMPORAL ENTRE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y DEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN UN SUELO BAJO DISTINTOS SISTEMAS DE LABOREO: ESTUDIO DE UNA CRONOSECUENCIA.

La finca “La Hampa” viene siendo utilizada como área experimental en un número elevado de trabajos científicos, entre los cuales destacan cinco proyectos de investigación con financiación ministerial (CICYT), 16 trabajos en revistas incluidas en el SCI, 32 comunicaciones en congresos, una tesis doctoral y cinco capítulos de libros.

La amplia caracterización que se viene realizando desde el año 1991 ha producido una gran cantidad de datos de tipo climático, físico, químico, bioquímico y agronómico. El establecimiento de tres experimentos de distinta duración, en los que se comparan distintos sistemas de laboreo, ha permitido evaluar los cambios que éstos ocasionan en el suelo, no sólo en función del manejo, sino también del tiempo de actuación. Este trabajo de tesis se centra principalmente en la parte física, química y bioquímica de esa investigación, considerando conjuntamente los tres experimentos, aspecto que no se había abordado hasta el momento. Los aspectos agronómicos han sido presentados en otros trabajos (López-Garrido, 2010; López-Garrido *et al.*, 2009; Madejón *et al.*, 2007; Melero *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 1997; Murillo *et al.*, 2004).

En general, los trabajos realizados hasta el momento en las parcelas experimentales de la finca “La Hampa” han evidenciado que el establecimiento del LC (modalidades LR y NL) aumenta la MO y mejora el equilibrio bioquímico del suelo (Madejón *et al.*, 2007; Melero *et al.*, 2009; Murillo *et al.*, 2004). También se han detectado menores emisiones de CO₂ en las parcelas bajo LC en ensayos a medio y largo plazo (López-Garrido, 2010; López-Garrido *et al.*, 2009).

La mayor acumulación de carbono en las parcelas bajo laboreo de conservación descrita en la tabla IV.2 confirma que el NL y el LR son dos tipos de laboreo que pueden promover el secuestro de C en las capas superficiales del suelo.

En la finca “La Hampa” a medio y largo plazo se observó un secuestro de 4 y 5 toneladas de carbono orgánico por hectáreas en LR_L y NL_M, respectivamente, comparado con los correspondientes laboreos tradicionales, mientras que a corto plazo el NL_C secuestró 3 toneladas de carbono por hectáreas más que el LT_C y 2 más que el LR_C. Junto con los datos similares obtenidos en la finca “Las Navas”, esos resultados se traducen en una mejora de la calidad del suelo superficial y de la calidad medioambiental en general, limitando las emisiones de CO₂ y otros gases. Aunque aún se necesita una mayor investigación, efectuando muestreos a mayor profundidad para evaluar la redistribución de la MO producida por la vertedera, otros estudios anteriores en las parcelas de medio y largo plazo no han demostrado una acumulación de carbono en capa más profundas de las parcelas LT (López-Garrido *et al.*, 2011)

A pesar de que en la bibliografía existen trabajos que describen efectos negativos sobre el desarrollo y rendimiento de los cultivos del laboreo de conservación, en los ensayos realizados en la finca “La Hampa” nunca se obtuvieron cosechas menores en las parcelas bajo LR_L y NL_M en relación con los rendimientos con las parcelas bajo LT. El NL y, en menor medida el LR, provocaron cierto retraso de la germinación y emergencia de las plántulas, aunque sin llegar a afectar al crecimiento y rendimiento de los cultivos. Muy al contrario, bajo las particulares condiciones climatológicas de 1995, el año más seco desde el establecimiento del ensayo de larga duración, el LR limitó los daños causados por la escasez de agua, manteniendo mayor contenido de humedad en el suelo y permitiendo alcanzar valores cercanos a la normalidad en términos de altura de las plantas, área foliar, peso de las semillas y rendimiento del cultivo de girasol. En las parcelas bajo LT se produjo una pérdida casi total de la cosecha (Moreno *et al.*, 1997).

Como se indicó anteriormente, es necesario un esfuerzo adicional para caracterizar a nivel molecular la MO y profundizar en el conocimiento de su degradación. Por ello, y de forma similar a lo realizado en el trabajo anterior, finca “Las Navas”, se llevó a cabo un fraccionamiento físico de los distintos agregados que componen el suelo. En las fracciones así obtenidas, procedentes de las parcelas experimentales de los tres ensayos mencionados, se realizó un análisis químico y bioquímico, además de una caracterización por ¹³C CPMAS RMN de la MO.

Los resultados obtenidos en este trabajo parecen demostrar que la degradación de la MO en esta finca difiere de lo observado en la finca “Las Navas”. El establecimiento de los dos tipos de LC (LR y NL) en estas parcelas experimentales no ocasionó los cambios repentinos y cuantiosos que se registraron en el ensayo de “Las Navas”, probablemente porque el equilibrio de formación/degradación de la MO que estableció el NL en una finca altamente erosionable tuvo un carácter extremadamente más inestable que el equilibrio que el LR y el NL originaron en una suelo con un bajo contenido de MO y menor riesgo de erosión, como es el caso del de la finca “La Hampa”.

No obstante, la distribución de agregados en los dos muestreos, realizados a lo largo de un año, puso de manifiesto una tendencia similar a lo observado en la finca “Las Navas” (apartado IV.2, Fig. 2). Las diferencias significativas sólo se encontraron en el muestreo de septiembre 2010, en época seca, cuando la formación de pseudo-agregados bajo ambiente húmedo es menor; el LR_L ocasionó mayor cantidad de macroagregados ($\emptyset > 2\text{ mm}$) que LT_L, mientras que en el ensayo de media duración, LN_M originó más agregados de las fracciones 1-2 mm y 0,5-1 mm y menos micro-agregados que el LT_M. Estos resultados confirman que el laboreo de conservación favorece la formación de agregados de mayor tamaño (Jiao *et al.*, 2006; Plaza-Bonilla *et al.*, 2010; Six *et al.*, 1999).

El análisis de los parámetros químicos y bioquímicos (apartado IV.2, Fig. 3, 4 y 5) de los agregados separados por tamaño confirmó que el laboreo de conservación presenta mayor capacidad que el tradicional para secuestrar carbono orgánico en forma de COT, CH, POxC, y generar un mayor nivel de actividad enzimática (DHA y β -glu).

La razón alquílicos/*O*-alquílicos de las fracciones de tamaño medio (\emptyset 1-2 mm y \emptyset 0,5-1 mm) del ensayo de media duración no presentó diferencias notables, mientras que en las restantes fracciones de este ensayo, y en todas las fracciones del ensayo de larga duración, los resultados fueron razonablemente similares a los obtenidos en “Las Navas”, presentando el LR_L una MO más fresca y rica en carbohidratos que el LT_L en todas sus fracciones (apartado IV.2, Fig. 6).

Cabe destacar que, en este ensayo, el POxC y β -glu fueron los parámetros que mostraron diferencias significativas en todas las fracciones y en los dos muestreos, lo que evidencia su idoneidad como índices de calidad del suelo.

- *Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence farm under different tillages evaluated by enzymatic activities and ^{13}C CPMAS NMR.*

En la MO del suelo se pueden distinguir varias fracciones según la densidad o las propiedades químicas. Después de observar los cambios originados por diferentes tipos de laboreo en las fincas “Las Navas” y “La Hampa”, se plantearon varias hipótesis sobre los cambios cualitativos que la MO puede sufrir debidos al laboreo.

En concreto, se quiso evaluar si el LT acelera simplemente la degradación de los compuestos orgánicos debido a los cambios en la estructura y a la falta de material vegetal fresco en superficie, o si estos cambios originaban otras “vías alternativas” de degradación y la acumulación selectiva de otras clases de compuestos orgánicos.

Los resultados obtenidos (apartado V.3, tabla 2) confirmaron que no siempre los parámetros bioquímicos responden a corto plazo a los cambios originados por el laboreo y que deben de elegirse los más adecuados según las condiciones edafoclimáticas. En nuestras condiciones, la β -glu se ha mostrado como un índice de calidad del suelo fiable (Madejón *et al.*, 2007; Melero *et al.*, 2011) h confirmado en nuestro estudio, donde se obtuvieron valores significativamente más altos en las muestras superficiales de los tratamientos de conservación en todos los experimentos. Debido a su acción hidrolítica de los enlaces glucosídicos, esta actividad está fuertemente relacionada con la abundancia de residuos de cultivo y por consiguiente con la cantidad de COT en superficie. Este último parámetro requiere un tiempo mayor para mostrar diferencias significativas (Roldán *et al.*, 2005), que se obtuvieron en los ensayos de larga y de media duración. En el ensayo de corta duración, el COT fue mayor en los tratamientos de conservación, pero sin llegar a una significación estadística. La actividad PA también mostró diferencias significativas en las muestras superficiales de los tres experimentos y también otros autores (Deng y Tabatabai, 1997) encontraron correlaciones positivas entre los valores de PA y la cantidad de COT del suelo. En el caso de los restantes parámetros, la ASA mostró diferencias en las muestras RT_L y NT_M comparadas con los correspondientes tratamientos TT, mientras que a corto plazo mostró valores más altos bajo NT_S , pero sin alcanzar significación estadística. Teniendo en cuenta el

interés de los resultados obtenidos para las actividades PA y ASA, se sugiere que también se optimicen y se apliquen las técnicas de RMN para evaluar los ciclos de fósforo y azufre, y poder obtener así un cuadro completo de los ciclos de degradación y acumulación de la MO.

Los parámetros DHA y CBM mostraron valores más altos en los tratamientos de conservación, con diferencias significativas respecto a LT en el ensayo de larga duración. La alta variabilidad observada en estos parámetros bajo nuestras condiciones experimentales (Melero *et al.*, 2011) puede depender de la también alta variabilidad que caracteriza a las condiciones climáticas bajo clima Mediterráneo; en estas condiciones, es difícil para los microorganismos encontrar un *optimum* de temperatura y humedad por para su crecimiento.

Los resultados obtenidos para la actividad PR parecen indicar la existencia de una falta de sustrato disponible, originada por la permanencia de una elevada cantidad de material peptídico en las fracciones de suelo masivo, húmicas y de MOP-O. Ese material puede estar constituido por exoenzimas o proteínas encapsuladas (Knicker y Hatcher, 1997) o de material citoplásmico atrapado en fragmentos de membrana celular (Miltner *et al.*, 2012), que sustraen parte del sustrato de la actividad microbiana, lo que se refleja en los resultados obtenidos. No obstante, los valores de PR pueden considerarse normales, similares a los límites inferiores obtenidos en otros suelos (Ladd y Butler, 1972; Marinari *et al.*, 2006; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000).

Los análisis de RMN evidenciaron que las muestras de suelo masivo tienen una composición más parecida a la de los ácidos húmicos que a la de la MOP-L, es decir, que la MO del suelo presenta un estado de degradación más avanzado, rica en estructuras alquílicas, carboxílicas y aromáticas (apartado V.3, figura 1). En las muestras de suelo masivo y de MOP de los tratamientos LT de larga y, en menor medida, de media duración se encontró una elevada cantidad de compuestos aromáticos (apartado V.3, figuras 2 y 4). En estas parcelas, los residuos del cultivo se quemaron hasta el año 2005, lo que condujo a la aparición de compuestos aromáticos de tipo “black carbon”, que se forman a causa de la incompleta combustión de estos residuos (González-Pérez *et al.*, 2004; Knicker, 2007, 2011). La falta de residuos frescos en estos tratamientos, ricos en *O*- y *N*- alquílicos, aumentó el porcentaje de intensidad de la región aromática.

En los ensayos de corto y medio plazo se confirmó lo obtenido en la finca “Las Navas” bajo no laboreo, donde se obtuvo una mayor cantidad de *O*-alquílicos y menor cantidad de alquílicos en suelo masivo superficial (apartado V.3, figura 2). En consecuencia, las razones alquílicos/*O*-alquílicos fueron menores en las parcelas NL que en las correspondientes parcelas LT. Estas características son típicas de una MO que recibe constantemente inputs de carbono fresco aportado por los residuos del cultivo, mientras que una acumulación de alquílicos es típica de una MO más degradada (Baldock y Preston, 1995; Kögel-Knabner y Ziegler, 1993; Preston y Trofymow, 2000). En el ensayo de larga duración se obtuvieron resultados diferentes. Esto puede ser debido a diferentes factores: i) el NL es el tratamiento que produce la mayor tasa de acumulación de COT, mientras que el LR se sitúa un escalón por debajo; ii) después de 21 años de manejo bajo LR_L, las muestras de HAC presentan un elevado grado de humificación, con una abundancia de estructuras aromáticas y carboxílicas superior a lo observado en las muestras LT_L, LT_M y NL_M, (apartado V.3, figura 3) que afectaría a la composición de las muestras de suelo masivo iii) la abundancia de compuestos aromáticos en las muestras de suelo masivo de LT_L (apartado V.3, figura 2) puede haber disminuido la aportación relativa de otras regiones espectrales, como la alifática.

En conclusión, las muestras de MOP, tanto en su fracción libre como en la ocluida, parecen resumir de manera eficaz todas las características de las parcelas que se evaluaron. En los tres ensayos, la MOP-L se caracterizó como una fracción de MO rica en compuestos *O*-alquílicos procedentes de residuos de los cultivos recientes (Golchin *et al.*, 1994; Jastrow, 1996; John *et al.*, 2005). Los tratamientos de conservación mostraron un mayor contenido de *O*-alquílicos y un menor contenido de alquílicos. También se pudieron observar las consecuencias de la quema de los residuos en las parcelas LT_L y, en menor medida, LT_M, con una acumulación de compuestos aromáticos que no se observó en las parcelas de corta duración donde nunca se quemaron los residuos.

Los mismos resultados se obtuvieron para las fracciones de MOP-O, aunque las intensidades relativas de cada región fueron diferentes si se comparan con las de la MOP-L. La fracción ocluida de la MOP se caracteriza por ser una MO más degradada y unida a las arcillas del suelo. Según Golchin *et al.* (1994), esta fracción puede proceder de los restos de las raíces de los cultivos y acaba siendo fuertemente

perturbada por las labores agrícolas. En ella, las regiones *O*-alquílica, aromática y alquílica llegan a tener intensidades comparables a las de los tratamientos de conservación, que siguen teniendo una mayor cantidad de compuestos fácilmente degradables, mientras que LT se caracteriza por una mayor abundancia de compuestos más recalcitrantes. Estudios recientes han propuesto un método alternativo de separación de las fracciones de MO, que permite distinguir entre MO contenida en los micro y macroagregados (Plaza *et al.*, 2012). Análisis sobre estas fracciones han destacado la importancia de los microorganismos adheridos a la superficie de las partículas de arcilla para explicar los mecanismos de secuestro y degradación de la MO (Courtier-Murias *et al.*, 2013; Plaza *et al.*, 2013).

Junto con los datos de RMN, las muestras de ácidos húmicos y fúlvicos se analizaron por espectrometría de masas FT-ICR (fig. IV.7). Estos datos preliminares parecen ser muy prometedores, dado que la técnica permitió identificar en las muestras de HAc unos 200 compuestos más en LR_L que en las de LT_L. En las muestras de fúlvicos se identificaron 100 compuestos más en las muestras correspondientes a LR_L que en las de LT_L. Esto parece indicar que la abundancia de residuos provoca la creación de diferentes patrones metabólicos.

Combinar estos análisis de RMN y MS de alta definición con los análisis químicos y bioquímicos y ampliar los ensayos incluyendo análisis de fósforo, nitrógeno y azufre son aspectos sobre los que se debe incidir para profundizar el conocimiento de los ciclos de acumulación y degradación de la SOM, y establecer, bajo diferentes condiciones edafoclimáticas, qué parámetros son más fiables como índices de calidad del suelo. Después de analizar los resultados de este trabajo, la β -glu, la PA y el COT parecen ser los índices de calidad más relevantes en nuestras condiciones de suelo y clima. Además, y a pesar de su elevado coste y tiempo de preparación de muestras, las técnicas espectrofotométricas proporcionan resultados que destacan por su cantidad, fiabilidad y resolución, lo que permite una evaluación global de la calidad de la MO muy precisa.

VI.4. LABOREO DE CONSERVACIÓN Y USO DE HERBICIDAS: INFLUENCIA DEL GLIFOSATO SOBRE LOS BIOINDICADORES DE CALIDAD DEL SUELO.

➤ *Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage.*

Para evaluar los beneficios que puede producir un tipo de laboreo es necesario tener en cuenta todos los aspectos, tanto positivos como negativos, relacionados con su implementación. En los trabajos “*Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in SW, Spain: Effect on soil quality*” y “*Moldboard plowing effects on soil aggregation and soil organic matter quality assessed by ¹³C CPMAS NMR and biochemical analyses*” se ha detallado la necesidad de unas labores esporádicas por parte de los agricultores que adoptan el NL cuando surgieran problemas de compactación, y/o proliferación de malas hierbas, ya que podría verse perjudicada la germinación de las plántulas con la consecuente pérdida parcial de cosecha en los casos más extremos (Lal *et al.*, 2007). Para obviar el problema de las malas hierbas, los laboreos de conservación pueden requerir, además, la aplicación de métodos de manejo integrado, que fundamentalmente se traduce en la aplicación de diversos tipos de biocidas.

Si bien se conocen los posibles problemas de contaminación medioambiental que pueden provocar algunas de esas moléculas (Giesy *et al.*, 2000; Solomon y Thompson, 2003), el trabajo “*Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage*” se ha enfocado esencialmente en la interacción del herbicida glifosato con los microorganismos del suelo y con sus actividades enzimáticas. Aunque los herbicidas modernos están diseñados para evitar cualquier interacción con el metabolismo microbiano y de los vertebrados (Speir y Ross, 2002), su aplicación puede resultar, o bien nociva, o incluso generar un aumento de fuentes de nutrientes que pueden alterar los equilibrios bioquímicos en el suelo (Busse *et al.*, 2001; Gianfreda y Rao, 2008; Reinecke *et al.*, 2002; Zabaloy *et al.*, 2008). Dado que las actividades enzimáticas se consideran como bioindicadores de la calidad de suelo, y por tanto de la actividad de su microfauna, los cambios que se pueden producir a causa de la aplicación de un herbicida pueden conducir a una interpretación errónea de los resultados, sobre todo si se comparan parcelas donde se

aplica normalmente el herbicida, como es el caso del LC, con otras que no prevén esa aplicación, como en el caso del LT.

Los resultados demostraron que, en el ensayo de incubación, el glifosato tuvo un efecto estimulador sobre DHA, β -glu y MBC, actuando como fuente de carbono hidrosoluble, efecto que, sorprendentemente, alcanzó los 50 días en el caso de DHA y 90 en el de la β -glu. Las condiciones del ensayo pudieron haber prolongado la persistencia del glifosato o de sus metabolitos en el suelo, alterando el equilibrio bioquímico normal. Otros autores (Araújo *et al.*, 2003; Veiga *et al.*, 2001) encontraron una persistencia de 30-35 días, mucho menor que la que se detectó en este ensayo.

El efecto estimulante que el glifosato tuvo sobre las propiedades bioquímicas del suelo se puede identificar con lo que algunos autores han denominado “priming effect” (Fontaine *et al.*, 2003; Kuzyakov *et al.*, 2000). La adición de un compuesto orgánico que puede actuar como una fuente de carbono y nutrientes se traduce en un aumento de la actividad microbiana, que conduce a su vez a un aumento de la mineralización de la MO o de su ‘turnover’, (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2008; Blagodatskaya *et al.*, 2007).

Según el trabajo de De Andréa *et al.* (2003), los efectos estimulantes del glifosato son más evidentes y persistentes en suelos que reciben aplicaciones repetidas del herbicida, confirmando la teoría de que los microorganismos pueden utilizar el glifosato como fuente de nutrientes y desarrollar patrones de oxidación que optimicen su degradación en el tiempo.

Por el contrario, en el ensayo de campo, el glifosato pareció seguir un proceso de degradación más rápido, probablemente gracias a la influencia de la temperatura, el viento y la luz solar, o a su percolación hacia estratos más profundos del suelo, lo que limitaría el tiempo de permanencia del herbicida en la capa superficial del suelo (Dick y Quinn, 1995). Los efectos estimulantes sobre las propiedades bioquímicas fueron por tanto de menor intensidad, con lo que las diferencias significativas entre tratamientos estuvieron más relacionadas con los efectos de los laboreos en sí, que con la aplicación del glifosato.

Debido a la variabilidad que presentaron los resultados de estos dos ensayos, y al hecho de que las actividades enzimáticas se utilizan normalmente como bioindicadores de calidad del suelo, es necesario evaluar en cada escenario en

particular si las diferencias que se registran en un suelo bajo distintos laboreos pudieran verse afectadas por efecto del glifosato. Para evitar este efecto colateral, siempre es aconsejable dejar pasar un periodo de tiempo de al menos 30 días entre la aplicación de herbicida y el muestreo del suelo, sobre todo cuando se aborde un estudio comparativo de indicadores bioquímicos, evitando así interpretaciones erróneas de los resultados.

VI. 5. LABOREO DE CONSERVACIÓN EN UNA PARCELA DE REGADÍO.

- *Effect of permanent bed planting combined with controlled traffic on soil chemical and biochemical properties in irrigated semi-arid Mediterranean conditions*

Las fincas de regadío son responsables del 40% de la producción agrícola mundial. Para tener un mayor conocimiento de los beneficios que la AC produce en los suelos agrícolas, parecía útil examinar sus efectos en una parcela experimental de regadío, en colaboración con el Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba (IAS-CSIC), una vez estudiados exhaustivamente sus efectos en secano. Para ello, se estableció el experimento descrito en el artículo “*Effect of permanent bed planting combined with controlled traffic on soil chemical and biochemical properties in irrigated semi-arid Mediterranean conditions*”.

En este ensayo se realizaron dos muestreos a lo largo de dos campañas de cultivo (algodón y maíz), y se analizaron muestras de suelos procedentes tanto de los lomos como de los surcos de labranza. La práctica normal de labrar los lomos después de cada campaña (laboreo tradicional o lomo tradicional, LT) aumenta los gastos operacionales de la finca y el consumo de combustible, además de que el pase de la maquinaria puede provocar compactación en los surcos sujetos a tráfico (Boulal *et al.*, 2011b). Para evitar estos problemas, se pueden adoptar técnicas donde los lomos permanecen en el suelo hasta la siguiente campaña y las labores se reducen al mínimo (lomo permanente, LP). Se evaluaron las diferencias bioquímicas y agronómicas entre los dos tipos de tratamientos presentes en la finca “Alameda del Obispo”. Se controló además el tráfico de la maquinaria circunscrito a determinados surcos (+T) para compararlo con los surcos no sujetos a tráfico (-T).

El análisis de componentes principales confirmó que en esta finca de regadío bajo condiciones mediterráneas, parámetros como COT, N-Kjel y β -glu (y DHA en menor medida) son indicadores fiables de los cambios originados por el manejo del suelo en la calidad del mismo. De forma similar a lo observado en fincas de secano, la mayor cantidad de residuos en superficie produce aumentos del COT y una mayor actividad metabólica de los enzimas que degradan los residuos orgánicos frescos, como la β -glu; sin embargo, esto no se confirmó para el CH, un indicador muy común en agricultura de secano ni para la DHA, que se mostraron de nuevo como parámetros sometidos a cierta variabilidad dependiendo de las condiciones climáticas y de cultivo (Feng *et al.*, 2003).

En las muestras tomadas en los lomos no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los parámetros analizados, debido probablemente al hecho que los residuos de cultivo tienden a deslizarse y acumularse en los surcos. Para evaluar los efectos del laboreo en una finca en regadío es pues aconsejable muestrear en los surcos.

Según un ensayo previo, el pase de la maquinaria agrícola produjo compactación del suelo y redujo la infiltración del agua (Boulal *et al.*, 2011a), sin embargo en este ensayo no se observaron diferencias significativas en los parámetros bioquímicos entre los surcos +T y -T, probablemente debido al corto tiempo de establecimiento (3 años) del experimento.

VI.6. INDICES DE CALIDAD APLICADOS EN FINCAS COMERCIALES.

La evaluación de los datos presentados en el apartado IV.4 requiere un atento análisis preliminar de las labores efectuadas en cada finca analizada. La rotación de cultivo seleccionada (trigo-girasol) es típica de la zona meridional de Andalucía, pero presenta cierta problemática debida a la escasa disponibilidad de maquinaria para llevar a cabo la siembra directa del girasol.

Normalmente, los agricultores definen el manejo de una finca como “laboreo mínimo” cuando la campaña del trigo se lleva a cabo en régimen de siembra directa y de no-laboreo, pero en la campaña siguiente, de girasol, efectúan unas labores pre-siembra mediante un pase de grada, cultivador o ‘chisel’ para superar la problemática derivada de la falta de la maquinaria de siembra directa para el girasol.

Las labores en el año de girasol se efectúan también para prevenir la compactación excesiva del suelo bajo no-laboreo durante los meses que preceden a la siembra, que en años particularmente secos podría afectar a la germinación de la semilla y producir importantes pérdidas de cosecha.

El conjunto de labores efectuadas en las fincas denominadas por los agricultores como de “laboreo mínimo” hace que los límites entre “laboreo de conservación” y “laboreo convencional” sean muy difusos, además de que no siempre se realiza un seguimiento adecuado de la superficie de suelo que queda cubierta por residuos. Y todo ello a pesar de que actualmente es cada vez menos frecuente la utilización de la vertedera con volteo del suelo, que los agricultores valoran como poco rentable económicamente y que conlleva problemáticas de erosión. Pero lo cierto es que la separación de “laboreo mínimo” y “laboreo convencional” se hace cada vez más complicada, dado que el mismo agricultor declara practicar uno u otro sin saber a ciencia cierta si cumple adecuadamente los requisitos que exige el laboreo de conservación.

Según se ha indicado, el manejo de los residuos es quizás uno de los principales requisitos del laboreo de conservación. La recogida de residuos para uso comercial, como venta de la paja de trigo para alimento de la ganadería, implicaría un establecimiento erróneo de las prácticas de laboreo de conservación, al mantener una cantidad insuficiente de residuos cubriendo la superficie del suelo

Por esta razón, cabe pensar que en estas condiciones los análisis del COT y β -glu no son concluyentes, dificultando la evaluación de la calidad de los suelos analizados. Conviene insistir, no obstante, en que al menos se ha logrado que el pase de la vertedera ya no sea una práctica común, lo que demuestra que los agricultores son receptivos a la experimentación científica que se viene desarrollando durante décadas. Sin embargo, aún queda camino por recorrer en este sentido, como lo demuestra el hecho de que con frecuencia no se consigue establecer adecuadamente un laboreo de conservación, lo que demuestra, a su vez, la importancia que se le debe dar a la divulgación científica.

Conclusiones

CONCLUSIONES.

Este trabajo de Tesis se ha desarrollado con el objetivo de profundizar en el conocimiento de las mejoras que el laboreo de conservación puede aportar a la calidad del suelo. Se evaluaron distintos parámetros químicos y bioquímicos del suelo y se analizaron mediante técnicas de espectrometría las muestras de materia orgánica del mismo. Los ensayos se llevaron a cabo en tres fincas diferentes, dos experimentales y una comercial, con la intención de establecer que índices de calidad del suelo son más fiables para futuras evaluaciones en fincas comerciales, así como para caracterizar los mecanismos de acumulación/degradación de la materia orgánica del suelo bajo distintos laboreos.

A continuación se exponen las conclusiones más relevantes:

- Los resultados obtenidos han confirmado un aumento general de la calidad del suelo bajo laboreo de conservación, en su modalidad de laboreo reducido y no laboreo, caracterizado por niveles más altos de distintas fracciones de carbono orgánico y actividades enzimáticas tanto en regadío como en secano.
- Los laboreos de conservación han demostrado una mayor efectividad en el secuestro de carbono orgánico, sobre todo en las capas superficiales del suelo. Este efecto se puede apreciar en los ensayos de corto plazo, pero alcanza su mayor magnitud en los suelos altamente erosionables y en los ensayos de larga duración.
- En los experimentos en secano, la erradicación de labores intensivas bajo laboreo de conservación permite la formación de un mayor número de macro-agregados que protegen la materia orgánica y limitan su degradación microbiana. El aumento de materia orgánica, que actúa como agente cementante, favorece aún más la formación de macro-agregados.
- Las labores intensivas (uso de vertedera con volteo del suelo) típicas del laboreo tradicional provocan la ruptura de los agregados y ocasionan enormes daños en fincas con elevado riesgo de erosión (formación de cárcavas). En estos casos el

no-laboreo es el sistema más adecuado; si fueran necesarias labores esporádicas para solventar problemas de compactación y proliferación de malas hierbas nunca se debe recurrir a la vertedera. El laboreo reducido, con la utilización de ‘chisel’, puede ser suficiente.

- El carbono orgánico total constituye un índice de calidad fiable, especialmente en el caso de ensayos a medio- y largo-plazo. A corto plazo, resultan más eficaces las propiedades bioquímicas, como las actividades enzimáticas, que responden de forma temprana a variaciones de manejo del suelo. Bajo nuestras condiciones experimentales, β -glucosidasa y fosfatasa alcalina fueron las más fiables, como índices de calidad, de todas las analizadas. No obstante, este tipo de parámetros suele presentar cierto nivel de variabilidad en función de las condiciones experimentales (época, suelo y cultivo), condiciones que deben ser especificadas con precisión.
- Los análisis de RMN confirmaron que el laboreo tradicional, con el uso de la vertedera y enterramiento de los residuos, aumenta la degradación de la materia orgánica superficial del suelo, favoreciendo la acumulación de compuestos menos reactivos como los alquílicos, en detrimento de compuestos de más fácil oxidación como los *O*-alquílicos.
- Las técnicas espectrométricas de RMN y FT-ICR MS poseen una gran potencialidad para la caracterización de la materia orgánica del suelo a nivel molecular. A pesar de su elevado coste y tiempo necesario de preparación de muestras, los datos obtenidos destacan por su cantidad, fiabilidad y resolución, lo que permite confirmar las hipótesis generadas a partir de la medida de otras variables, químicas y bioquímicas, sobre la dinámica de degradación de la materia orgánica.
- En regadío, las mayores diferencias entre tratamientos tradicionales y de conservación suelen observarse en los surcos de labranza, donde los residuos tienden a acumularse. A corto plazo, la maquinaria puede producir compactación del suelo en los surcos, aunque sin alterar los valores de actividades enzimáticas. El carbono orgánico total y la β -glucosidasa

confirmaron que también pueden ser índices de calidad fiables bajo estas condiciones.

- La necesidad de utilizar herbicidas en los tratamientos de conservación (sobre todo en el no-laboreo) puede estimular la actividad microbiana (efecto “priming”) y aumentar así los niveles de actividades enzimáticas y fracciones lábiles de carbono orgánico. En concreto, el glifosato demostró alterar los parámetros bioquímicos varios días después de su aplicación durante un ensayo de incubación. En condiciones de campo, este efecto fue menos acusado. Dado que los tratamientos tradicionales prescinden de la aplicación de herbicidas, para llevar a cabo una comparación entre diferentes tratamientos es aconsejable dejar un intervalo de 30 días como mínimo entre la aplicación del herbicida y el muestreo de suelo.
- En las fincas comerciales seleccionadas se detectó que el uso de la vertedera ya es prácticamente inexistente, a causa de los problemas medioambientales que genera y del elevado coste operacional que conlleva. Sin embargo, se ha detectado que, con frecuencia, los agricultores no establecen adecuadamente los sistemas de laboreo de conservación, debido fundamentalmente a un inadecuado manejo de residuos. Esto ha motivado que índices de calidad de suelos muy fiables a nivel de parcela experimental hayan tenido una respuesta muy limitada a nivel de finca comercial.

En conjunto, los resultados obtenidos, tanto a nivel bioquímico como molecular confirman la idoneidad de los sistemas de laboreo de conservación para nuestras condiciones de suelo, clima y manejo (secano y regadío, con distintas rotaciones de cultivos). Las técnicas de alta resolución utilizadas permitieron evaluar aspectos poco estudiados sobre los ciclos de acumulación/degradación de la materia orgánica.

Sin embargo, es necesario realizar un mayor esfuerzo en transmitir estos conocimientos a los agricultores para conseguir una mayor optimización de los beneficios que pueden derivarse de la implantación de la Agricultura de Conservación en Andalucía.

CONCLUSIONS.

The present Thesis work has been carried out in order to enhance the knowledge about the benefits that conservation agriculture could provide to soil quality.

Several soil chemical and biochemical parameters have been evaluated and soil organic matter has been characterized by high resolution spectrometric techniques.

The experimental part has been performed in two experimental farms and in one commercial farm with the aim of choosing the most reliable soil quality indexes for future application on commercial farms. The obtained data have been used for a deeper characterization of the accumulation/degradation cycles of soil organic matter under different tillages.

The most relevant conclusions are listed below:

- The obtained results confirmed that conservation tillages, no-tillage and reduced tillage, produced a general improvement of soil quality, defined by higher levels of soil organic carbon pools and enzymatic activities.
- Conservation tillages demonstrated a better efficacy for soil organic carbon sequestration, especially at surface. This effect could be noticeable even for short term experiments, but it reaches the higher magnitude for highly erodible soil and for long term essays.
- The eradication of intensive plowing practices under conservation tillage allows the formation of a higher amount of macro-aggregates that protect soil organic matter and limit its microbial degradation. In turn, the augment of soil organic matter quantity enhance the formation of macro-aggregates by binding together soil particles.
- Intensive plowing practices (moldboard plow with soil inversion) of traditional tillage provoke the aggregates disruption and could create large erosion gullies in erosion-prone farms. No-tillage is the most adequate soil management type for these farms; moldboard is not even an option in case of a sporadic tillage is

necessary in order to solve soil compaction or weeds proliferation problems, whereas chisel plow constitutes a better option.

- Total organic carbon is a reliable soil quality index, especially for long- and mid-term essays. For short-term experiment, biochemical parameters such as enzymatic activities are considered most effective as early responding indexes. For our experimental conditions, β -glucosidase, and alkaline phosphatase were the most representative and reliable soil quality indexes among the other analyzed parameters. Nevertheless, these parameters could present a high variability depending on soil and crop type, and climatic conditions.
- NMR analyses confirmed that the moldboard plowing and the residues burial of traditional tillage enhanced the soil organic matter degradation at surface. This type of tillage favored the accumulation of more recalcitrant compounds, such as alkyls, to detriment of easily oxidizable *O*-alkyls compounds.
- High resolution techniques of spectrometry, such as CP MAS NMR and FT-ICR MS, have a great potential for soil organic matter characterization at a molecular level. In spite of high costs and time needed to prepare samples, these instruments provide a great quantity of reliable and highly resolved data that can enhance the characterization of soil organic matter and confirm the hypotheses developed after the analyses of other parameters.
- The major differences between conventional and conservation tillages in a farm under irrigation were found in furrows, where residues tend to accumulate. At short-term, the wheel passes of the machinery could produce soil compaction in furrows but enzymatic activities were not affected by traffic. Total organic carbon and β -glucosidase confirmed their reliability also for irrigated farms.
- The required use of herbicide for conservation tillage (especially under no-tillage) could stimulate microbial activity (priming effect) and increase the levels of enzymatic activities and labile organic pools. In an incubation experiment, glyphosate altered soil biochemical parameters up to several days after its application; this effect was less noticeable for the on-field essay. Since the use of herbicides is not required for traditional treatments, it is recommendable to leave

an interval of at least 30 days between glyphosate application and soil sampling, when a tillage comparison experiment is being carried out.

- In the commercial farms evaluated, environmental problems and high costs are turning the use of moldboard plowing into an infrequent tillage practice. Nevertheless, an uncorrected establishment of conservation tillages by the farmers has been frequently detected, especially due to an inadequate crop residues management. Due to these conditions, the response of the indexes of soil quality selected for experimental farms has been limited in the commercial farms evaluated.

Globally, the obtained results confirmed the suitability of conservation tillage systems under our soil, climate and crop rotation conditions. High resolution techniques of spectrometry permitted the evaluation of new aspects of accumulation and degradation cycles of soil organic matter.

Nevertheless, a greater effort is necessary for outreach this knowledge to the farmers in order to optimize the benefits that conservation agriculture implementation could provide in Andalucía.

Bibliografia

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS INCLUIDAS EN EL TEXTO:

(Se remite al texto de las publicaciones para las referencias incluidas en los artículos).

- Álvaro-Fuentes, J., Arrúe, J.L., Gracia, R., López, M.V., 2007.** Soil management effects on aggregate dynamics in semiarid Aragon (NE Spain). *Science of The Total Environment* 378, 179-182.
- Álvaro-Fuentes, J., Arrúe, J.L., Gracia, R., López, M.V., 2008a.** Tillage and cropping intensification effects on soil aggregation: Temporal dynamics and controlling factors under semiarid conditions. *Geoderma* 145, 390-396.
- Álvaro-Fuentes, J., Cantero-Martínez, C., López, M.V., Paustian, K., Denef, K., Stewart, C.E., Arrúe, J.L., 2009.** Soil aggregation and soil organic carbon stabilization: Effects of management in semiarid mediterranean agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal* 73, 1519-1529.
- Álvaro-Fuentes, J., Morell, F.J., Madejón, E., Lampurlanés, J., Arrúe, J.L., Cantero-Martínez, C., 2013.** Soil biochemical properties in a semiarid Mediterranean agroecosystem as affected by long-term tillage and N fertilization. *Soil and Tillage Research* 129, 69-74.
- Álvaro-Fuentes, J., López, M.V., Cantero-Martínez, C., Arrúe, J.L., 2008b.** Tillage effects on soil organic carbon fractions in Mediterranean dryland agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal* 72, 541-547.
- Alvear, M., Rosas, A., Rouanet, J.L., Borie, F., 2005.** Effects of three soil tillage systems on some biological activities in an Ultisol from southern Chile. *Soil and Tillage Research* 82, 195-202.
- Amézketa, E., 1999.** Soil aggregate stability: A review. *Journal of Sustainable Agriculture* 14, 83-151.
- Angers, D.A., Bissonnette, N., Legere, A., Samson, N., 1993.** Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. *Canadian Journal of Soil Science* 73, 39-50.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R., Abarkeli, R.B., 2003.** Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799-804.

- Arshad, M.A., Franzluebbers, A.J., Azooz, R.H., 1999.** Components of surface soil structure under conventional and no-tillage in northwestern Canada. *Soil and Tillage Research* 53, 41-47.
- Baldock, J.A., Preston, C.M., 1995.** Chemistry of carbon decomposition processes in forests as revealed by solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. En: Kelly, J.M., McFee, W.W. (Eds.), *Carbon forms and functions in forest soils*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 89-117.
- Baldock, J.A., Smernik, R.J., 2002.** Chemical composition and bioavailability of thermally altered *Pinus resinosa* (Red pine) wood. *Organic Geochemistry* 33, 1093-1109.
- Ball, B.C., Scott, A., Parker, J.P., 1999.** Field N₂O, CO₂ and CH₄ fluxes in relation to tillage, compaction and soil quality in Scotland. *Soil and Tillage Research* 53, 29-39.
- Berns, A.E., Conte, P., 2011.** Effect of ramp size and sample spinning speed on CPMAS ¹³C NMR spectra of soil organic matter. *Organic Geochemistry* 42, 926-935.
- Berns, A.E., Philipp, H., Narres, H.D., Burauel, P., Vereecken, H., Tappe, W., 2008.** Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Soil Science* 59, 540-550.
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2008.** Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: Critical review. *Biology and Fertility of Soils* 45, 115-131.
- Blagodatskaya, E.V., Blagodatsky, S.A., Anderson, T.H., Kuzyakov, Y., 2007.** Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology* 37, 95-105.
- Blevins, R.L., Frye, W.W., 1993.** Conservation tillage: An ecological approach to soil management. *Adv. Agron.* 51, 33-78.
- Boix-Fayos, C., Calvo-Cases, A., Imeson, A.C., Soriano-Soto, M.D., 2001.** Influence of soil properties on the aggregation of some Mediterranean soils and the use of aggregate size and stability as land degradation indicators. *Catena* 44, 47-67.

- Bond, J. J., Willis, W. D. 1969.** Soil water evaporation: surface residue rate and placement effects. *Soil Science Society of America Proceedings*, 33, 445-448.
- Boulal, H., Gómez-Macpherson, H., Gómez, J.A., Mateos, L., 2011a.** Effect of soil management and traffic on soil erosion in irrigated annual crops. *Soil and Tillage Research* 115-116, 62-70.
- Boulal, H., Gómez-Macpherson, H., Villalobos, F.J., 2012.** Permanent bed planting in irrigated Mediterranean conditions: Short-term effects on soil quality, crop yield and water use efficiency. *Field Crops Research* 130, 120-127.
- Boulal, H., Mateos, L., Gómez-Macpherson, H., 2011b.** Soil management and traffic effects on infiltration of irrigation water applied using sprinklers. *Irrigation Science* 29, 403-412.
- Bradford, J.M., Peterson, G.A., 2000.** Conservation tillage. *Handbook of Soil Science*, 247-270.
- Bronick, C.J., Lal, R., 2005.** Soil structure and management: A review. *Geoderma* 124, 3-22.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J., Powers, R.F., 2001.** Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1777-1789.
- Cantero-Martinez, C., Westfall, D.G., Sherrod, L.A., Peterson, G.A., 2006.** Long-term crop residue dynamics in no-till cropping systems under semi-arid conditions. *Journal of Soil and Water Conservation* 61, 84-95.
- Cerdá, A., 2008.** Erosión y degradación del suelo agrícola en España. Cátedra Divulgación de la Ciencia, Universitat de València, Valencia.
- Cochran, V.L., Sparrow, S.D., Sparrow, E.B., 1994.** Residue effects on soil micro- and macroorganisms. *Managing Agricultural Residues*, 163-184.
- Conservation Technology Information Center, 1996.** A checklist for U.S. farmers, West Lafayette, IN.
- Culman, S.W., Snapp, S.S., Freeman, M.A., Schipanski, M.E., Beniston, J., Lal, R., Drinkwater, L.E., Franzluebbers, A.J., Glover, J.D., Stuart Grandy, A., Lee, J., Six, J., Maul, J.E., Mirksy, S.B., Spargo, J.T., Wander, M.M., 2012.** Permanganate oxidizable carbon reflects a processed soil fraction that is sensitive to management. *Soil Science Society of America Journal* 76, 494-504.

- Courtier-Murias, D., Simpson, A.J., Marzadori, C., Baldoni, G., Ciavatta, C., Fernández, J.M., López-de-Sá, E.G., Plaza, C., 2013.** Unraveling the long-term stabilization mechanisms of organic materials in soils by physical fractionation and NMR spectroscopy. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 171, 9-18.
- De Andréa, M.M., Peres, T.B., Luchini, L.C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M.B., Tedeschi Savoy, V.L., 2003.** Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38, 1329-1335.
- Deng, S.P., Tabatabai, M.A., 1997.** Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biology and Fertility of Soils* 24, 141-146.
- Dick, R.P., 1994.** Soil enzyme activities as indicators of soil quality. Defining soil quality for a sustainable environment. *Proceedings symposium, Minneapolis, MN, 1992*, 107-124.
- Dick, R.E., Quinn, J.P., 1995.** Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 545–550.
- Diekow, J., Mielniczuk, J., Knicker, H., Bayer, C., Dick, D.P., Kögel-Knabner, I., 2005.** Carbon and nitrogen stocks in physical fractions of a subtropical Acrisol as influenced by long-term no-till cropping systems and N fertilisation. *Plant and Soil* 268, 319-328.
- Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A., 1994.** Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin*.
- Douglas, J.T., Goss, M.J., 1982.** Stability and organic matter content of surface soil aggregates under different methods of cultivation and in grassland. *Soil and Tillage Research* 2, 155-175.
- Dungait, J.A.J., Hopkins, D.W., Gregory, A.S., Whitmore, A.P., 2012.** Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. *Global Change Biology* 18, 1781-1796.

- Feng, Y., Motta, A.C., Reeves, D.W., Burmester, C.H., Van Santen, E., Osborne, J.A., 2003.** Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1693-1703.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003.** The priming effect of organic matter: A question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837-843.
- Franzluebbers, A.J., 2002a.** Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil and Tillage Research* 66, 95-106.
- Franzluebbers, A.J., 2002b.** Water infiltration and soil structure related to organic matter and its stratification with depth. *Soil and Tillage Research* 66, 197-205.
- Franzluebbers, A.J., 2004.** Tillage and Residue Management Effects on Soil Organic Matter. En: Magdoff, F., Weil, R.R. (Eds.), *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. CRC Press, Boca Raton, pp. 227-268.
- Gajri, P.R., Arora, V.K., Prihar, S.S., 2002.** *Tillage for sustainable cropping*. International Book Distributing co., Lucknow, India.
- García, C., Gil, F., Hernández, T., Trasar-Cepeda, C., 2003.** Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mundi-Prensa, Murcia, Spain.
- García Torres, L.A., González Fernández, P.A., 1997.** *Agricultura de conservación: fundamentos agronómicos, medioambientales y económicos*. Asociación Española Laboreo de Conservación/Suelos Vivos (AELC/SV), Córdoba.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., 2008.** Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 38, 269-310.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000.** Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167, 35-120.
- Gil Ribes, J., 1997.** La maquinaria Agrícola en el Laboreo de Conservación. . En: *Agricultura de Conservación: Fundamentos Agronómicos, Medioambientales y Económicos*. García Torres, L., González Fernández, P. (Eds.) Asociación Española de Laboreo de Conservación/Suelos Vivos, Córdoba, 157-171.

- Giráldez Cervera J V. 1997.** Efectos de los diferentes sistemas de laboreo sobre las propiedades físicas del suelo. En: Agricultura de Conservación: Fundamentos Agronómicos, Medioambientales y Económicos. García Torres, L., González Fernández, P. (Eds.). Asociación Española Laboreo de Conservación/Suelos Vivos, Córdoba, 53-72.
- Golchin, A., Oades, J., Skjemstad, J., Clarke, P., 1994.** Study of free and occluded particulate organic matter in soils by solid state ^{13}C CPMAS NMR spectroscopy and scanning electron microscopy. Soil Research 32, 285-309.
- Gomes, L., Arrúe, J.L., López, M.V., Sterk, G., Richard, D., Gracia, R., Sabre, M., Gaudichet, A., Frangi, J.P., 2003.** Wind erosion in a semiarid agricultural area of Spain: The WELSONS project. Catena 52, 235-256.
- Gonçalves, C.N., Dalmolin, R.S.D., Dick, D.P., Knicker, H., Klamt, E., Kögel-Knabner, I., 2003.** The effect of 10% HF treatment on the resolution of CPMAS ^{13}C NMR spectra and on the quality of organic matter in Ferralsols. Geoderma 116, 373-392.
- González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Almendros, G., Knicker, H., 2004.** The effect of fire on soil organic matter - A review. Environment International 30, 855-870.
- Gregorich, E.G., Wen, G., Voroney, R.P., Kachanoski, R.G., 1990.** Calibration of a rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry 22, 1009-1011.
- Hatcher, P.G., Dria, K.J., Kim, S., Frazier, S.W., 2001.** Modern analytical studies of humic substances. Soil Science 166, 770-794.
- Hayes, T.M., Hayes, M.H.B., Swift, R.S., 2012.** Detailed investigation of organic matter components in extracts and drainage waters from a soil under long term cultivation. Organic Geochemistry 52, 13-22.
- Hernanz, J.L., López, R., Navarrete, L., Sánchez-Girón, V., 2002.** Long-term effects of tillage systems and rotations on soil structural stability and organic carbon stratification in semiarid central Spain. Soil and Tillage Research 66 (2), 129-141.
- Hooker, D.C., Vyn, T.J., 2000.** Critical soil factors affecting early corn growth and yield in conservation tillage: A multi-variable approach. Proceedings of the 15th International Conference on Soil Tillage Research Organisation 82, 1-10.

- Horne, D.J., Ross, C.W., Hughes, K.A., 1992.** Ten years of a maize/oats rotation under three tillage systems on a silt loam in New Zealand. 1. A comparison of some soil properties. *Soil and Tillage Research* 22, 131-143.
- Hycka, M., 1980.** Veza común, su cultivo y utilización, 3ª ed. corr. y aum., Zaragoza, EEAD, (Boletines de la Estación Experimentnal de Aula Dei, n. 10).
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 1995.** Second Assessment Report (SAR).
- Jastrow, J.D., 1996.** Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral- associated organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 665-676.
- Jiao, Y., Whalen, J.K., Hendershot, W.H., 2006.** No-tillage and manure applications increase aggregation and improve nutrient retention in a sandy-loam soil. *Geoderma* 134, 24-33.
- John, B., Yamashita, T., Ludwig, B., Flessa, H., 2005.** Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils under different types of land use. *Geoderma* 128, 63-79.
- Johnston, A.E., Poulton, P.R., Coleman, K., 2009.** Soil organic matter: its importance in sustainable agriculture and carbon dioxide fluxes. En: Sparks, D.S. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 1–57 (Chapter 1).
- Kessavalou, A., Mosier, A.R., Doran, J.W., Drijber, R.A., Lyon, D.J., Heinemeyer, O., 1998.** Fluxes of carbon dioxide, nitrous oxide, and methane in grass sod and winter wheat-fallow tillage management. *Journal of Environmental Quality* 27, 1094-1104.
- Kleber, M., Nico, P.S., Plante, A., Filley, T., Kramer, M., Swanston, C., Sollins, P., 2011.** Old and stable soil organic matter is not necessarily chemically recalcitrant: Implications for modeling concepts and temperature sensitivity. *Global Change Biology* 17, 1097-1107.
- Knicker, H., 2007.** How does fire affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon? A review. *Biogeochemistry* 85, 91-118.
- Knicker, H., 2011.** Pyrogenic organic matter in soil: Its origin and occurrence, its chemistry and survival in soil environments. *Quaternary International* 243, 251-263.

- Knicker, H., 2011.** Solid state CPMAS ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy in organic geochemistry and how spin dynamics can either aggravate or improve spectra interpretation. *Organic Geochemistry* 42, 867-890.
- Knicker, H., Hatcher, P.G., 1997.** Survival of protein in an organic-rich sediment: Possible protection by encapsulation in organic matter. *Naturwissenschaften* 84, 231-234.
- Knicker, H., Nikolova, R., Dick, D.P., Dalmolin, R.S.D., 2012.** Alteration of quality and stability of organic matter in grassland soils of Southern Brazil highlands after ceasing biannual burning. *Geoderma* 181-182, 11-21.
- Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., Marschner, B., Von Lützow, M., 2008.** An integrative approach of organic matter stabilization in temperate soils: Linking chemistry, physics, and biology. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 5-13.
- Kögel-Knabner, I., Ziegler, F., 1993.** Carbon distribution in different compartments of forest soils. *Geoderma* 56, 515-525.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000.** Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1485-1498.
- Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1972.** Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 19-30.
- Lal, R., 2000.** Soil conservation and restoration to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect. En: Rubio, J.L., Asins, S., Andreu, V., de Paz, J.M., Gimeno, E. (Eds.), *Key Notes, 3th International Congress European Society for Soil Conservation: Man and Soil at the Third Millenium*, Valencia, pp. 5-20.
- Lal, R., 2004.** Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1-22.
- Lal, R., Logan, T.J., Fausey, N.R., 1989.** Long-term tillage and wheel traffic effects on a poorly drained mollic ochraqualf in northwest Ohio. 2. Infiltrability, surface runoff, sub-surface flow and sediment transport. *Soil and Tillage Research* 14, 359-373.
- Lal, R., Reicosky, D.C., Hanson, J.D., 2007.** Evolution of the plow over 10,000 years and the rationale for no-till farming. *Soil and Tillage Research* 93, 1-12.

- Lampurlanés, J., Cantero-Martínez, C., 2006.** Hydraulic conductivity, residue cover and soil surface roughness under different tillage systems in semiarid conditions. *Soil and Tillage Research* 85, 13-26.
- Lavahun, M.F.E., Joergensen, R.G., Meyer, B., 1996.** Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. *Biology and Fertility of Soils* 23, 38-42.
- Leenheer, J.A., Croué, J.P., 2003.** Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37, 18A-26A.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.D.L., Cox, M.M., 2005.** *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman.
- Li, C., Narayanan, V., Harriss, R.C., 1996.** Model estimates of nitrous oxide emissions from agricultural lands in the United States. *Global Biogeochemical Cycles* 10, 297-306.
- López, M.V., Arrúe, J.L., 1997.** Growth, yield and water use efficiency of winter barley in response to conservation tillage in a semi-arid region of Spain. *Soil and Tillage Research* 44, 35-54.
- López, M.V., Gracia, R., Arrúe, J.L., 2000.** Effects of reduced tillage on soil surface properties affecting wind erosion in semiarid fallow lands of Central Aragon. *European Journal of Agronomy* 12, 191-199.
- López, M.V., Gracia, R., Arrúe, J.L., 2001.** An evaluation of wind erosion hazard in fallow lands of semiarid Aragon (NE Spain). *Journal of Soil and Water Conservation* 56, 212-219.
- López, M.V., Sabre, M., Gracia, R., Arrúe, J.L., Gomes, L., 1998.** Tillage effects on soil surface conditions and dust emission by wind erosion in semiarid Aragon (NE Spain). *Soil and Tillage Research* 45, 91-105.
- López-Fando, C., Bello Pérez, A., 1997.** Efecto de los sistemas de laboreo en la biología del suelo. En: *Agricultura de Conservación: Fundamentos Agronómicos, Medioambientales y Económicos*. García Torres, L., González Fernández, P. (Eds.). Asociación Española Laboreo de Conservación/Suelos Vivos, Córdoba, pp. 201-223.
- López-Garrido, R., 2010.** *Laboreo de Conservación: Efectos a Corto y Largo Plazo Sobre la Calidad del Suelo y el Desarrollo de los Cultivos*. Facultad de Química. Universidad de Sevilla.

- López-Garrido, R., Díaz-Espejo, A., Madejón, E., Murillo, J.M., Moreno, F., 2009.** Carbon losses by tillage under semi-arid Mediterranean rainfed agriculture (SW Spain). *Pérdidas de carbono debidas a laboreo bajo agricultura mediterránea de secano (SE España)* 7, 706-716.
- López-Garrido, R., Madejón, E., Murillo, J.M., Moreno, F., 2011.** Short and long-term distribution with depth of soil organic carbon and nutrients under traditional and conservation tillage in a Mediterranean environment (southwest Spain). *Soil Use and Management* 27, 177-185.
- Luelmo, J., 1975.** *Historia de la Agricultura en Europa y América.* Istmo.
- Madejón, E., Moreno, F., Murillo, J.M., Pelegrín, F., 2007.** Soil biochemical response to long-term conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 94, 346-352.
- Madejón, E., Moreno, F., Murillo, J.M., Pelegrín, F., 2007.** Soil biochemical response to long-term conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 94, 346-352.
- Madejón, E., Murillo, J.M., Moreno, F., López, M.V., Arrue, J.L., Alvaro-Fuentes, J., Cantero, C., 2009.** Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil and Tillage Research* 105, 55-62.
- Magdoff, F.W., R.R., 2004.** Soil organic matter management strategies. *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*, 45-65.
- Marinari, S., Mancinelli, R., Campiglia, E., Grego, S., 2006.** Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecological Indicators* 6, 701-711.
- Marschner, B., Brodowski, S., Dreves, A., Gleixner, G., Gude, A., Grootes, P.M., Hamer, U., Heim, A., Jandl, G., Ji, R., Kaiser, K., Kalbitz, K., Kramer, C., Leinweber, P., Rethemeyer, J., Schäffer, A., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., Wiesenberger, G.L.B., 2008.** How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 91-110.
- Martens, D.A., Emmerich, W., McLain, J.E.T., Johnsen, T.N., 2005.** Atmospheric carbon mitigation potential of agricultural management in the southwestern USA. *Soil and Tillage Research* 83, 95-119.

- Martínez Raya, A., Francia Martínez, J.R., 1997.** Efecto de los sistemas de laboreo en la erosión y escorrentía. En: Agricultura de Conservación: Fundamentos Agronómicos, Medioambientales y Económicos. García Torres, L., González Fernández, P. (Eds.). Asociación Española Laboreo de Conservación/Suelos Vivos, Córdoba, 13-38.
- Melero, S., López-Garrido, R., Murillo, J.M., Moreno, F., 2009.** Conservation tillage: Short- and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 104, 292-298.
- Melero, S., Panettieri, M., Madejón, E., Macpherson, H.G., Moreno, F., Murillo, J.M., 2011.** Implementation of chiselling and mouldboard ploughing in soil after 8 years of no-till management in SW, Spain: Effect on soil quality. *Soil and Tillage Research* 112, 107-113.
- Melero, S., Vanderlinden, K., Ruiz, J.C., Madejon, E., 2008.** Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *European Journal of Soil Biology* 44, 437-442.
- Miltner, A., Bombach, P., Schmidt-Brücken, B., Kästner, M., 2012.** SOM genesis: Microbial biomass as a significant source. *Biogeochemistry* 111, 41-55.
- Moreno, F., Arrúe, J.L., Cantero-Martínez, C., López, M.V., Murillo, J.M., Sombrero, A., López-Garrido, R., Madejón, E., Moret, D., Álvaro-Fuentes, J. (Eds.), 2010.** Conservation Agriculture Under Mediterranean Conditions y Spain. Springer Science+Business Media B.V.
- Moreno, F., Murillo, J.M., Madejón, E.; Girón, I.F., Pelegrín, F., 2005.** Laboreo de conservación: efectos a largo plazo sobre la calidad del suelo. Congreso Internacional sobre Agricultura de Conservación, Córdoba (España), 515-520.
- Moreno, F., Murillo, J.M., Pelegrín, F., Girón, I.F., 2006.** Long-term impact of conservation tillage on stratification ratio of soil organic carbon and loss of total and active CaCO_3 . *Soil and Tillage Research* 85, 86-93.
- Moreno, F., Pelegrín, F., Fernández, J.E., Murillo, J.M., 1997.** Soil physical properties, water depletion and crop development under traditional and conservation tillage in southern Spain. *Soil and Tillage Research* 41, 25-42.
- Mrabet, R., 2002.** Stratification of soil aggregation and organic matter under conservation tillage systems in Africa. *Soil and Tillage Research* 66, 119-128.

- Murillo, J.M., Moreno, F., Girón, I.F., Oblitas, M.I., 2004.** Conservation tillage: long term effect on soil and crops under rainfed conditions in south-west Spain (western Andalusia). *Journal of Agricultural Research* 2, 35-43.
- Murillo, J.M., Moreno, F., Madejón, E., Girón, I.F., Pelegrín, F., 2006.** Improving soil surface properties: A driving force for conservation tillage under semi-arid conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4, 97-104.
- Murillo, J.M., Moreno, F., Pelegrín, F., Fernández, J.E., 1998.** Responses of sunflower to traditional and conservation tillage under rainfed conditions in southern Spain. *Soil and Tillage Research* 49, 233-241.
- Nannipieri, P., Smalla, K., 2006.** *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Springer, Berlin (Germany).
- Nannipieri, P., 1994.** The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. En: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. Cirsio Publication, Australia, pp. 238-244.
- Nannipieri, P., Ciardi, C., Palazzi, T., Badalucco, L., 1990.** Short-term nitrogen reactions following the addition of urea to a grass-legume association. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 549-553.
- Oyonarte, C., Mingorance, M.D., Durante, P., Piñero, G., Barahona, E., 2007.** Indicators of change in the organic matter in arid soils. *Science of The Total Environment* 378, 133-137.
- Phillips, R.E., Blevins, R.L., Thomas, G.W., Frye, W.W., Phillips, S.H., 1980.** No-tillage agriculture. *Science* 208, 1108-1113.
- Plaster, E.J., 1992.** *Soil Science and Management*. Delmar Publishers Inc. New York, 514.
- Plaza, C., Courtier-Murias, D., Fernández, J.M., Polo, A., Simpson, A.J., 2013.** Physical, chemical, and biochemical mechanisms of soil organic matter stabilization under conservation tillage systems: A central role for microbes and microbial by-products in C sequestration. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 124-134.

- Plaza, C., Fernández, J.M., Pereira, E.I.P., Polo, A., 2012.** A comprehensive method for fractionating soil organic matter not protected and protected from decomposition by physical and chemical mechanisms. *Clean - Soil, Air, Water* 40, 134-139.
- Plaza-Bonilla, D., Cantero-Martínez, C., Álvaro-Fuentes, J., 2010.** Tillage effects on soil aggregation and soil organic carbon profile distribution under Mediterranean semi-arid conditions. *Soil Use and Management* 26, 465-474.
- Preston, C.M., Trofymow, J.A., 2000.** Variability in litter quality and its relationship to litter decay in Canadian forests. *Canadian Journal of Botany* 78, 1269-1287.
- Puglisi, E., Trevisan, M., 2012.** Effects of Methods of Carbon Sequestration in Soil on Biochemical Indicators of Soil Quality. En: Piccolo, A. (Ed.), *Carbon Sequestration in Agricultural Soils*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 179-207.
- Reinecke, A.J., Helling, B., Louw, K., Fourie, J., Reinecke, S.A., 2002.** The impact of different herbicides and cover crops on soil biological activity in vineyards in the Western Cape, South Africa. *Pedobiologia* 46, 475-484.
- Roldán, A., Salinas-García, J.R., Alguacil, M.M., Caravaca, F., 2005.** Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Applied Soil Ecology* 30, 11-20.
- Sánchez-Girón, V., Serrano, A., Hernanz, J.L., Navarrete, L., 2004.** Economic assessment of three long-term tillage systems for rainfed cereal and legume production in semiarid central Spain. *Soil Tillage and Research* 78 (1), 35-44.
- Schutter, M.E., Dick, R.P., 2002.** Microbial community profiles and activities among aggregates of winter fallow and cover-cropped soil. *Soil Science Society of America Journal* 66, 142-153.
- Silgram, M., Shepherd, M.A., 1999.** The Effects of Cultivation on Soil Nitrogen Mineralization. pp. 267-311.
- Simpson, A.J., McNally, D.J., Simpson, M.J., 2011.** NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 58, 97-175.

- Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., 1999.** Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-tillage systems. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1350-1358.
- Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., Doran, J.W., 1998.** Aggregation and soil organic matter accumulation in cultivated and native grassland soils. *Soil Science Society of America Journal* 62, 1367-1377.
- Skujins, J., 1976.** Extracellular enzymes in soil. *CRC critical reviews in microbiology* 4, 383-421.
- Sleighter, R.L., Chen, H., Wozniak, A.S., Willoughby, A.S., Caricasole, P., Hatcher, P.G., 2012.** Establishing a measure of reproducibility of ultrahigh-resolution mass spectra for complex mixtures of natural organic matter. *Analytical Chemistry* 84, 9184-9191.
- Soil Survey, S., 1999.** Soil taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. USDA-SCS. . Agri. Handbook 436.
- Sojka, R.E., Upchurch, D.R., 1999.** Reservations regarding the soil quality concept. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1039-1054.
- Solomon, K.R., Thompson, D.G., 2003.** Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* 6, 289-324.
- Sparling, G., Parfitt, R.L., Hewitt, A.E., Schipper, L.A., 2003.** Three approaches to define desired soil organic matter contents. *Journal of Environmental Quality* 32, 760-766.
- Speir, T.W., Ross, D.J., 2002.** Hydrolytic Enzyme Activities to Assess Soil Degradation and Recovery. En: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 407-431.
- SSSA, 1987.** Soil Science Society of America: Glossary of soil science terms. Madison, WI.
- Tabatabai, M.A., 1982.** Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis*, 903-947.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969.** Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 301-307.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1970.** Arylsulfatase Activity of Soils¹. *Soil Science Society of America Journal* 34, 225-229.

- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2000.** Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1867-1875.
- Trevors, J.T., 1984.** Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 673-674.
- Unger, P.W., McCalla, T.M., 1980.** Conservation Tillage Systems. pp. 1-58.
- Urbano-Terrón, P., 1992.** Tratado de Fitotecnia General. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Valentine, J., Clifton-Brown, J., Hastings, A., Robson, P., Allison, G., Smith, P., 2012.** Food vs. fuel: The use of land for lignocellulosic 'next generation' energy crops that minimize competition with primary food production. *GCB Bioenergy* 4, 1-19.
- van Krevelen, D.W., 1950.** Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. *Fuel* 29, 269-284.
- Veiga, F., Zapata, J.M., Fernandez Marcos, M.L., Alvarez, E., 2001.** Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Science of The Total Environment* 271, 135-144.
- Velasquez, E., Lavelle, P., Andrade, M., 2007.** GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 3066-3080.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934.** An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29-38.
- Warkentin, B.P., 2001.** The tillage effect in sustaining soil functions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164, 345-350.
- Weil, R.R., Islam, K.R., Stine, M.A., Gruver, J.B., Samson-Liebig, S.E., 2003.** Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *American Journal of Alternative Agriculture* 18, 3-17.
- Weil, R.R., Magdoff, F., 2004.** Significance of soil organic matter to soil quality and health. En: Magdoff, F., Weil, R.R. (Eds.), *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-43.
- Wuest, S.B., Albrecht, S.L., Skirvin, K.W., 2000.** Crop residue position and interference with wheat seedling development. *Soil and Tillage Research* 55, 175-182.

- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Gómez, M.A., 2008.** An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40, 1-12.
- Zhong, J., Sleighter, R.L., Salmon, E., McKee, G.A., Hatcher, P.G., 2011.** Combining advanced NMR techniques with ultrahigh resolution mass spectrometry: A new strategy for molecular scale characterization of macromolecular components of soil and sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry* 42, 903-916.
- Zornoza, R., Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Arcenegui, V., Mataix-Beneyto, J., Gómez, I., 2008.** Validating the effectiveness and sensitivity of two soil quality indices based on natural forest soils under Mediterranean conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2079-2087.